

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 25 May 2000 (25.05.00)	
International application No.: PCT/JP99/06275	Applicant's or agent's file reference: 2569WO0P
International filing date: 11 November 1999 (11.11.99)	Priority date: 13 November 1998 (13.11.98)
Applicant: SUGINO, Hiroshi	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
24 January 2000 (24.01.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PCT
PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP99/06275

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 18 January 2001 (18.01.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2569WOOP	
International application No. PCT/JP99/06275	International filing date (day/month/year) 11 November 1999 (11.11.99)
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AU,CA,CN,CZ,NO,NZ,PL,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AL,AM,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CR,CU,DM,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UZ,VN,YU,ZA,OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;">Eliott Peretti</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06275

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl.⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/21, A01K 67/027, A61K31/7088, A61K35/76, A61K38/02, A61K45/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P25/08, A61P25/14, A61P43/00, A61P25/00, A61K48/00, A61K48/00, A61K39/395,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl.⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/21, A01K 67/027, A61K31/7088, A61K35/76, A61K38/02, A61K45/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P25/08, A61P25/14, A61P43/00, A61P25/00, A61K48/00, A61K48/00, A61K39/395,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq/EMBL/DDBJ/Genbank

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Shoji H., et al. "Identification of a novel type II activin receptor, type IIA-N, induced during the neural differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells.", Biochemical Biophysical Research Communications (1998, May), Vol.246, No.2, p.320-324	17 1-16, 18-28, 30
X A	Sugino H., et al. "Activin: diversity of functions and signal transduction", Seikagaku(1996), Vol68, No.8, p.1405-1428	17 1-16, 18-28, 30
X A	Funaba M., et al. "Immunolocalization of type I or type II activin receptors in the rat brain", Journal of Neuroendocrinology(1997), Vol.9, No.2, p.105-111	26 1-25, 27, 28, 30
X A	WO, 94/6456, A (Genentech INC), 31 March, 1994 (31.03.94), Claim 23 & JP, 8-501314, A Claim 23 & EP, 661993, A1 & US, 5654404, A & US, 5703048, A	26, 27 1-25, 28, 30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 14 January, 2000 (14.01.00)

Date of mailing of the international search report
 25 January, 2000 (25.01.00)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06275

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	EP, 771873, A2 (Takeda Chem. Ind. Ltd.), 07 May, 1997 (07.05.97), Claim 1, 20 & JP, 10-72497, A Claim 1, 21	17, 26 1-16, 18-25, 27, 28, 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06275

Box I. Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claim 29 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by this International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2) (a)(i) and Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II. Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

m.H

特 許 協 力 条 約

PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 2569WOOP	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06275	国際出願日 (日.月.年) 1. 11. 99	優先日 (日.月.年) 13. 11. 98
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 29 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲29は、人の身体の治療による処置方法に該当するものであるから、PCT 17条(2)(a)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/21, A01K 67/027, A61K31/7088, A61K35/76, A61K38/02, A61K45/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P25/08, A61P25/14, A61P43/00, A61P25/00, A61K48/00, A61K48/00, A61K39/395,

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/21, A01K 67/027, A61K31/7088, A61K35/76, A61K38/02, A61K45/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P25/08, A61P25/14, A61P43/00, A61P25/00, A61K48/00, A61K48/00, A61K39/395,

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq/EMBL/DDBJ/Genbank

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Shoji H., et al. "Identification of a novel type II activin receptor, type IIA-N, induced during the neural differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells.", Biochemical Biophysical Research Communications (1998, May), Vol. 246, No. 2, p. 320-324	17 1-16, 18-28, 30
X A	Sugino H., et al. "Activin: diversity of functions and signal transduction", Seikagaku (1996), Vol. 68, No. 8, p. 1405-1428	17 1-16, 18-28, 30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 01. 00

国際調査報告の発送日

25.01.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4 N 9 1 5 2

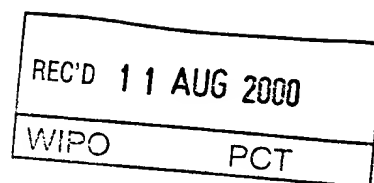
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Funaba M., et al. "Immunolocalization of type I or type II activin receptors in the rat brain", Journal of Neuroendocrinology(1997), Vol. 9, No. 2, p. 105-111	26 1-25, 27, 28, 30
X A	WO, 94/6456, A (Genentech INC) 31. 3月. 1994 (31. 03. 94) 請求項 2 3 &JP, 8-501314, A 請求項 2 3 &EP, 661993, A1 &US, 5654404, A &US5703048, A	26, 27 1-25, 28, 30
X A	EP, 771873, A2 (Takeda Chem Ind Ltd) 7. 5月. 1997 (07. 05. 97) 請求項 1 及び 2 0 &JP, 10-72497, A 請求項 1 及び 2 1	17, 26 1-16, 18-25, 27, 28, 30

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕



出願人又は代理人 の書類記号 2569WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/06275	国際出願日 (日.月.年) 11.11.99	優先日 (日.月.年) 13.11.98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/21, A01K 67/027, A61K31/7088, A61K35/76, A61K38/02		
出願人 (氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 24.01.00	国際予備審査報告を作成した日 01.08.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 N 9152



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | |
|-------------------------------------|----------------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

- 請求の範囲 29

請求の範囲29は、人の身体の治療による処置方法に該当するものであるから、PCT34条(4)(a)及びPCT規則67.1(iv)の規定により、この国際予備審査機関が予備審査をすることを要しない対象に係るものである。

- ☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 _____ が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- ☒ 請求の範囲 29 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

- ☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲	1-16、18-25、28、30	有
請求の範囲	17、26、27	無

進歩性(IS)

請求の範囲	1-16、18-25、28、30	有
請求の範囲	17、26、27	無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲	1-28、30	有
請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求項17

文献1: Shoji H., et al. "Identification of a novel type II activin receptor, type IIA-N, induced during the neural differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells.", Biochemical Biophysical Research Communications(1998, May), Vol. 246, No. 2, p. 320-324

文献2: Sugino H., et al. "Activin: diversity of functions and signal transduction", Seikagaku(1996), Vol. 68, No. 8, p. 1405-1428

文献5: EP, 771873, A2 (Takeda Chem Ind Ltd) 7.5月. 1997(07.05.97)

請求項1及び20 & JP, 10-72497, A 請求項1及び21

文献1、2、5には、アクチビン受容体について記載されている。アクチビン受容体は、本願の請求項1に記載の蛋白質に結合するものである。

請求項26

文献3: Funaba M., et al. "Immunolocalization of type I or type II activin receptors in the rat brain", Journal of Neuroendocrinology(1997), Vol. 9, No. 2, p. 105-111

文献4: WO, 94/6456, A (Genentech INC) 31.3月. 1994(31.03.94) 請求項23 & JP, 8-501314, A 請求項23 & EP, 661993, A1 & US, 5654404, A & US, 5703048, A

文献3には、アクチビン受容体に対する抗体について記載されている。

文献4には、アクチビンアンタゴニストについて記載されている。

文献5には、アクチビンレセプターアゴニスト、アクチビンレセプターアンタゴニストについて記載されている。

これらの物質は、本願の請求項1に記載の蛋白質と請求項17に記載の化合物との結合に影響をもつものと認められる。

請求項27

文献4には、アクチビンアンタゴニストを医薬として使用することが記載されている。



•
•
•
•

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協定条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 1/21, A01K 67/027, A61K 31/7088, 35/76, 38/02, 45/00, A61P 25/16, 25/28, 25/08, 25/14, 43/00, 25/00, A61K 48/00, 39/395		A1	(11) 国際公開番号 WO00/29570
			(43) 国際公開日 2000年5月25日 (25.05.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06275		(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)	
(22) 国際出願日 1999年11月11日 (11.11.99)		添付公開書類 国際調査報告書	
(30) 優先権データ 特願平10/323199 1998年11月13日 (13.11.98) JP 特願平10/346925 1998年12月7日 (07.12.98) JP			
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)			
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 杉野 弘 (SUGINO, Hiroshi) [JP/JP] 〒770-8041 徳島県徳島市上八万町西山1325番地 Tokushima, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 高橋秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)			
(54) Title: NOVEL PROTEIN AND UTILIZATION THEREOF			
(54) 発明の名称 新規蛋白質およびその用途			
(57) Abstract A protein which is expressed particularly in the brain, has a PDZ domain and/or a WW domain and shows an affinity with, in particular, activin receptor and/or activin intracellular signal transducer molecule, its peptide fragment or a salt thereof which are useful in determining a binding protein capable of binding to the above protein and screening a compound inhibiting or promoting the binding of the binding protein to the above-described protein, etc.			

(57)要約

特に脳で発現し、PDZドメインまたは(および)WWドメインを持つ、とりわけアクチビン受容体または(および)アクチビン細胞内情報伝達分子に親和性を有する本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩は、該蛋白質に対する結合能を有する結合蛋白質の決定や、本発明の蛋白質等と結合蛋白質との結合を阻害または促進する化合物のスクリーニングなどに有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	ウガンダ
CI	コートジボアール	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明 細 書

新規蛋白質およびその用途

5 技術分野

本発明は、特定のアミノ酸配列を有し、PDZドメインまたは（および）WWドメインを有し、脳に特異的に発現する新規蛋白質、該蛋白質をコードするDNA領域を含有するDNA、該蛋白質の製造方法および該蛋白質ならびにDNAの用途に関する。

10

背景技術

従来、多数の生理活性物質が単離・同定され、その機能が解明されつつある。そのなかには、種々の臓器あるいは細胞で多様な活性を示すものもあることが知られている。種々の臓器あるいは細胞における多様な生理活性は、通常、該生理活性物質が結合する受容体を介して具現化しているが、その受容体に結合する生理活性物質の組み合わせがすべての臓器・細胞において同一なのか、あるいは各臓器・細胞に特異的なのかは、解明されていない例が多い。

生理活性蛋白質の中にはPDZドメインやWWドメインを持つものがある。これらドメインは比較的最近見いだされた蛋白質結合ドメインモジュールである。そのため、PDZドメインやWWドメインを持つ蛋白質の生体内での分布、機能、制御機構などはまだ多くが不明である。

PDZドメインを持つ蛋白質は、その蛋白質結合の機能を介して、細胞膜の裏打ち構造や細胞骨格のネットワーク形成、さらに細胞内表層に発達した細胞内シグナル伝達のネットワーク形成などに重要な役割を担っていると考えられる。神経系においては、神経伝達物質受容体やイオンチャンネルなどの複合体形成に係わるなど、シナプス部位の蛋白質クラスターのアセンブリーに欠かせない。また、最近、シナプス可塑性に伴い発現が調節されるPDZ蛋白質が見出され、PDZ蛋白質が受容体の再配置などを通じて可塑性に伴うシナプスの形態変化に係わっている可能性があり、発生段階の神経ネットワークの構築

や生体の脳の高次機能にも関与していると考えられる。PDZドメインは既知のペプチド結合ドメインとの共通点もあるが、明らかな特徴的な点も有している。

PDZドメインは細菌から高等植物、動物にまで広く保存されたドメインであり、多くの場合、PDZドメインが認識するのは標的蛋白質のC末端の短いアミノ酸配列で、これらの標的蛋白質は膜貫通型受容体やチャンネルであることが多い。PDZドメインは同一蛋白質中に2から6回程度繰り返された形で見いだされることが多く、また、ほかのドメインモジュールとは異なり、そのいくつかはホモダイマーを形成する。これらは、PDZドメインがシナプスなどの細胞表面構造やタイトジャンクションなど、細胞間接着における蛋白質架橋ネットワークやマイクロドメインの形成などに係わるための重要な特徴である。

一方、WWドメインも酵母から哺乳類までよく保存された約40アミノ酸から成るドメインであり、プロリンに富むPYモチーフと呼ばれる比較的短いアミノ酸配列を認識して結合する。WWドメインを持つ蛋白質としては、ユビキチン蛋白質リガーゼ、ジストロフィン、ホルミン結合蛋白質などがある。こうした蛋白質には、1～4個のWWドメインが直列に連なった形で存在している。WWドメインをもつ蛋白質は他の蛋白質間相互作用にかかわるドメインやプロテオフォスターゼ、rasGAPなどの酵素活性ドメインを持つものが多く、WWドメインが非常に多岐にわたる生体機能を持つことを示唆している。

アクチビンは、脳下垂体前葉からの卵胞刺激ホルモン(FSH)の分泌を促進する調節因子である。従来、脳下垂体からの性腺刺激ホルモンの分泌調節は、生殖腺で生産されるステロイドホルモンが主であると考えられていたが、アクチビンおよびこれと相反する作用をもつインヒビンの発見により視床下部－脳下垂体－生殖器官系の新しいホルモン分泌調節機構として関心を集めている。アクチビンの生理活性の解析が進むにつれて、この系は、FSH分泌調節以外に血球系や生殖器官の細胞の分化誘導あるいは阻害活性、神経細胞生存維持活性などの多様な生理活性を有することが解ったが、その詳細な機構については未だ解明されていない点が多い。

本発明は、特に脳で発現するPDZドメインまたは（および）WWドメインを持つ蛋白質および該蛋白質に対する結合能を有する受容体（例えば、アクチビン受容体）および細胞内情報伝達分子（例えば、Smad）の生理活性の解明、並びにアクチビン-アクチビン受容体系の神経系組織での細胞分化阻害および神経栄養因子様活性の詳細な分子機構等を解明する手段として、新規な該蛋白質の単離法ならびに検出法、該新規蛋白質遺伝子を含むDNA、該新規蛋白質遺伝子がコードする蛋白質の製造法、および該DNAならびに該蛋白質の用途を提供することを目的とする。

10 発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意研究を行った結果、配列番号：1で表されるマウスアクチビンIIA-N受容体蛋白質の細胞内領域をベイト（bait）とした酵母ツーハイブリッド（two-hybrid）法を用い、マウス脳cDNAライブラリーより結合蛋白質の探索を行い、COS7細胞内でもアクチビンIIA-N受容体との結合が確認できるcDNAクローンを得た。さらに、このクローンがコードする遺伝子の全長を含むcDNAクローンを単離し解析したところ、5個のPDZドメインと2個のWWドメインをコードする領域を含む遺伝子であることを見いだした。この遺伝子にコードされる該蛋白質は、複数の蛋白質-蛋白質相互作用ドメインを持つ蛋白質因子であり、そのうちのPDZドメインを介して、1）アクチビン受容体の細胞内領域と結合し、その結果、アクチビンの細胞内への情報伝達を阻害すること、2）他のサイトカイン類の受容体の細胞内領域とは結合せず、それらの細胞内情報伝達には影響を及ぼさないことを見いだした。また、もう一つのWWドメインを介してアクチビン細胞内情報伝達分子と結合して、アクチビンの細胞内への情報伝達を阻害することを見いだした。

さらに、本発明者らは、マウスの各種臓器からpoly(A)⁺RNAを抽出し、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：4に示すDNAをプローブとして用い、ノーザンハイブリダイゼーション法にて本発明の新規蛋白質の発現を調べたところ、図23に示すように、特に脳でその発現が多く見られる

ことを見いだした。このことから、該新規蛋白質を加えたアクチビン-アクチビン受容体情報伝達系は、脳細胞の増殖・分化の制御を司っていることが示唆され、脳・神経系疾患の診断、治療等への応用できることを見いだした。

5 本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

1. 配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩、
2. 配列番号：6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩、
- 10 3. PDZドメインおよびWWドメインを有し、脳に特異的に発現し、アクチビン受容体または（および）アクチビン細胞内情報伝達分子に対する結合能を有する第1項または第2項記載の蛋白質、
4. アクチビン細胞内情報伝達分子がSmad3である第3項記載の蛋白質。
- 15 5. 5つのPDZドメインおよび2つのWWドメインを有し、脳に特異的に発現し、アクチビン受容体およびSmad3に対する結合能を有する第1項または第2項記載の蛋白質、
6. 第1項記載の蛋白質の部分ペプチド、第2項記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、
- 20 7. 第1項記載の蛋白質または第2項記載の蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有する組換えDNA、
8. 配列番号：7で表される塩基配列、配列番号：8で表される塩基配列またはそれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する第7項記載のDNA、
- 25 9. 第6項記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する組換えDNA、
10. 第7項記載のDNAを含有する組換えベクター、
11. 第10項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、
12. 第11項記載の形質転換体を培養し、第1項記載の蛋白質または第2項

記載の蛋白質を生成・蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質またはその塩の製造方法、

13. 第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

5 14. 第13項記載の抗体に対して、第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩を含有する被検液および標識化された第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩を競合的に反応させることを特徴とする第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩の定量方法、

10 15. 第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩と結合する蛋白質の決定方法、

16. ①転写因子のDNA結合領域に第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質または第6項記載の部分ペプチドを融合させた発現ベクターと②被検蛋白質をコードする遺伝子と転写活性化領域との融合ライブラリーとを、該転写因子結合領域をプロモーター上に保持しているレポーター遺伝子を持つ宿主細胞に導入し、第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質または第6項記載の部分ペプチドと被検蛋白質との結合により上昇するレポーター遺伝子の発現量の変化を測定することを特徴とする第15項記載の決定方法、

20 17. 第15項記載の方法により得られる、第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩と結合する蛋白質またはその塩、

18. 第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩と、第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

25 19. 標識した第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩をアクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達

分子に接触させた場合と、標識した第 1 項記載の蛋白質、第 2 項記載の蛋白質、第 6 項記載の部分ペプチドまたはその塩および試験化合物をアクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に接触させた場合における、標識した第 1 項記載の蛋白質、第 2 項記載の蛋白質、第 6 項記載の部分ペプチドまたはその塩のアクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする第 1 項記載の蛋白質、第 2 項記載の蛋白質、第 6 項記載の部分ペプチドまたはその塩とアクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

20. 標識した第 1 項記載の蛋白質、第 2 項記載の蛋白質、第 6 項記載の部分ペプチドまたはその塩を第 1 7 項記載の蛋白質またはその塩に接触させた場合と、標識した第 1 項記載の蛋白質、第 2 項記載の蛋白質またはその塩および試験化合物を第 1 7 項記載の蛋白質またはその塩に接触させた場合における、標識した第 1 項記載の蛋白質、第 2 項記載の蛋白質、第 6 項記載の部分ペプチドまたはその塩の第 1 7 項記載の蛋白質またはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする第 1 項記載の蛋白質、第 2 項記載の蛋白質、第 6 項記載の部分ペプチドまたはその塩と第 1 7 項記載の蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

21. 第 1 7 項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞に第 1 項記載の蛋白質、第 2 項記載の蛋白質、第 6 項記載の部分ペプチドまたはその塩を導入した場合と、第 1 7 項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞に第 1 項記載の蛋白質、第 2 項記載の蛋白質、第 6 項記載の部分ペプチドまたはその塩および試験化合物を導入した場合における、第 1 項記載の蛋白質、第 2 項記載の蛋白質、第 6 項記載の部分ペプチドまたはその塩の該細胞内における第 1 7 項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする第 1 項記載の蛋白質、第 2 項記載の蛋白質、第 6 項記載の部分ペプチドまたはその塩と第 1 7 項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビ

ン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

22. 標識した第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩を第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩および試験化合物を第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩の該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする標識した第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩と第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

23. 第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞に第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質またはその塩を導入した場合と、第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞に第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩および試験化合物を導入した場合における、第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩と第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

24. ツー ハイブリッド (two-hybrid) 法を用いることを特徴とする第16項記載の蛋白質の決定方法または第18項～第23項のいずれかに記載のスクリーニング方法、

25. 第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩と、第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

26. 第18項～第23項のいずれかに記載のスクリーニング方法または第25項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、第1項記載の蛋白質、第2項記載の蛋白質、第6項記載の部分ペプチドまたはその塩と、第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩、

27. 第17項記載の蛋白質、第26項記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

28. アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん症またはハンチントン舞踏症の予防・治療剤である第27項記載の医薬、

29. 哺乳動物に対して第17項記載の蛋白質、第26項記載の化合物またはその塩を有効量投与することを特徴とする第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防・治療方法、および

30. 第17項記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防・治療剤を製造するための第17項記載の蛋白質、第26項記載の化合物またはその塩の使用を提供する。

さらに、本発明は、

31. 蛋白質が、配列番号：5で表されるアミノ酸配列、配列番号：5で表されるアミノ酸配列中における配列番号：6以外のアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、2個以上10個以下）のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、配列番号：5で表されるアミノ酸配列中における配列番号：6以外のアミノ酸配列中に1または2個以上（好ましくは、2個以上10個以下）のアミノ酸配列が付加または挿入されたアミノ酸配列、あるいは配列番号：5で表さ

れるアミノ酸配列における配列番号：6 以外のアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、2 個以上 10 個以下）のアミノ酸配列が他のアミノ酸と置換されたアミノ酸配列を含有する第 1 項記載の蛋白質およびそれらの塩、

3 2. 酵母を用いる第 2 4 項記載のツーハイブリッド法、

5 3 3. 第 1 9 項～第 2 3 項のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られる化合物またはその塩、

3 4. 第 3 3 項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬組成物、

10 3 5. 外来性の第 7 項記載の DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物、

3 6. 非ヒト哺乳動物がげっ歯類動物である第 3 5 項記載の非ヒト哺乳動物、

3 7. げっ歯類動物がマウスまたはラットである第 3 5 項記載の非ヒト哺乳動物、および

15 3 8. 外来性の第 7 項記載の DNA またはその変異 DNA を含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は本発明の新規蛋白質をコードする cDNA の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。

20 図 2 は本発明の新規蛋白質をコードする cDNA の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図 2 は図 1 の続きである。

図 3 は本発明の新規蛋白質をコードする cDNA の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図 3 は図 2 の続きである。

25 図 4 は本発明の新規蛋白質をコードする cDNA の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図 4 は図 3 の続きである。

図 5 は本発明の新規蛋白質をコードする cDNA の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図 5 は図 4 の続きである。

図 6 は本発明の新規蛋白質をコードする cDNA の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図 6 は図 5 の続きである。

図 7 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図 7 は図 6 の続きである。

図 8 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図 8 は図 7 の続きである。

5 図 9 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図 9 は図 8 の続きである。

図 1 0 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図 1 0 は図 9 の続きである。

10 図 1 1 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図 1 1 は図 1 0 の続きである。

図 1 2 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。

15 図 1 3 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図 1 3 は図 1 2 の続きである。

図 1 4 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図 1 4 は図 1 3 の続きである。

20 図 1 5 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図 1 5 は図 1 4 の続きである。

25 図 1 6 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図 1 6 は図 1 5 の続きである。

図 1 7 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図 1 7 は図 1 6 の続きである。

図 1 8 は本発明の新規蛋白質をコードする c D N A の全塩基配列とそれにコ

ードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図18は図17の続きである。

図19は本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図19は図18の続きである。

図20は本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図20は図19の続きである。

図21は本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図21は図20の続きである。

図22は本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図22は図21の続きである。

図23はノーザンハイブリダイゼーションによる発現の解析結果を示す。

図24は本発明の新規蛋白質とSmad3との特異的相互作用を調べた結果を示す。横軸のARIP1は本発明の新規蛋白質を示す。縦軸の相互作用はルシフェラーゼ活性の強さを示す。

20 発明を実施するための最良の形態

本発明の配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞〔例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例えば、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球など）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれらの細胞の前駆細胞

5 胞、幹細胞もしくはガン化細胞など] もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織 [例えば、脳、脳の各部位 (例えば、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳など) 脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管 (例えば、大腸、小腸など)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、

10 睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など] または血球系の細胞もしくはその培養細胞株など (特に脳) に由来する蛋白質であってもよく、合成蛋白質であってもよい。

配列番号: 5 または配列番号: 6 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一の
10 アミノ酸配列を含有する蛋白質とは、配列番号: 5 または配列番号: 6 で表されるアミノ酸配列と約 50% 以上、好ましくは約 70% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号: 5 または配列番号: 6 で表されるアミノ酸配列と実質的
15 に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質とは、例えば、前記の配列番号: 5 または配列番号: 6 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号: 5 または配列番号: 6 で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同一の生理活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同一の生理活性としては、例えば、受容体親和性、シグナル情報伝
20 達能、臓器発現分布の特異性などの質的要素が挙げられる。実質的に同一とは、それらの生理活性が生物学的または生理学的に同質であることを示す。したがって、受容体親和性の強さなどの活性が同等 (例えば、約 0.1 ~ 20 倍、好ましくは約 0.5 ~ 2 倍) であることが好ましいが、これらの活性の強弱、蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

25 例えば、受容体親和性の測定は、自体公知の方法に準じて行うことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明の蛋白質としては、例えば、配列番号: 5 または配列番号: 6 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1 から 30 個程度、より好ましくは 1 から 10 個程度、さらに好ましくは数個) のアミノ酸が

欠失したアミノ酸配列、配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1から30個程度、より好ましくは1から10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加または挿入されたアミノ酸配列、配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1から30個程度、より好ましくは1から10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質などのいわゆるムテインも含まれる。

本明細書における蛋白質は、ペプチド表記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとする、本発明の蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルもしくは n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチル、 α -ナフチルメチルなどの C_{6-12} アリール- C_{1-2} アルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられる。

本発明の蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば、上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の蛋白質には、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン酸残基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上にある、例えば、 OH 、 COO

H、NH₂、SHなどが適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

5 本発明の蛋白質の具体例としては、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質などが用いられる。

本発明の蛋白質は、PDZドメインまたは（および）WWドメイン、好ましくは、5つのPDZドメインまたは（および）2つのWWドメインを有し、脳に特異的に発現している。そして、本発明の蛋白質は、PDZドメインを介してセリン／スレオニンキナーゼ型受容体として単離されたアクチビン受容体
10 に結合し、また、WWドメインを介してアクチビンの細胞内情報伝達分子と結合する。

アクチビン受容体は、アクチビン受容体の何れのサブタイプであってもよいが、なかでもアクチビン受容体ⅠⅠA-Nなどが好ましく用いられる。

15 アクチビンの細胞内情報伝達分子としては、例えば、Smad1, 2, 3, 4, 5, 6, 7などのSmadが挙げられるが、本発明の蛋白質は、特にSmad3と強く結合する。

本発明の蛋白質としては、特に、5つのPDZドメインおよび2つのWWドメインを有し、脳に特異的に発現し、アクチビン受容体または（および）Smad3に対して結合能を有する蛋白質が好ましく用いられる。

20

本発明の蛋白質の部分ペプチドとしては、前記した本発明の蛋白質の部分ペプチドであって、本発明の蛋白質が有する生理活性、例えば、受容体親和性、シグナル情報伝達能などの活性、臓器発現分布の特異性などを有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち
25 100個以上、好ましくは250個以上、さらに好ましくは350個以上、より好ましくは500個以上、最も好ましくは800個以上のアミノ酸配列を有し、受容体親和性、シグナル情報伝達能などを有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好

ましくは1から10個程度、さらに好ましくは数個)のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1から20個程度、より好ましくは1から10個程度、さらに好ましくは数個)のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1から10個程度、より好ましくは数個程度、さらに好ましくは1から5個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基($-COOH$)またはカルボキシレート($-COO^-$)であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド($-CONH_2$)またはエステル($-COOR$)であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断されて生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明の部分ペプチドは、好ましくは、アクチビン受容体または(および)前述したアクチビン細胞内情報伝達分子(特に、Smad3)に対する結合能を有している。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。また、無機塩基(例えば、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属、アルミニウムまたはアンモニウムなど)との塩、有機塩基(例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ピリジンジールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなど)との

塩なども用いられる。

本発明の蛋白質またはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知の方法によっても製造することもできるし、後述する該蛋白質を
5 コードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを
10 組合せることにより単離精製することができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-
15 (2', 4'-ジメトキシフェニルヒドロキシメチル) フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル) フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

25 上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOO

B t) とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはH O B t エステルあるいはH O O B t エステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行った後に樹脂に添加することができる。

- 5 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなど
- 10 のエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃から50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5から4倍過剰で用いられる。ニンヒ
- 15 ドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

- 20 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、tert-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

- 25 カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、tert-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化、（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステ

ル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*tert*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*tert*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、*Bz* 1、*Cl*₂-*Bz* 1、2-ニトロベンジル、*Br*-*Z*、*tert*-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、*To* s、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、*DNP*、ベンジルオキシメチル、*Bum*、*Boc*、*Trt*、*Fmoc*などが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、*HONB*、*N*-ヒドロキシスクシミド、*HOBT*）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、*Pd* 黒あるいは*Pd*-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また、液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃から40℃の温度で行われるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオール

などのようなカチオン補足剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

10 蛋白質またはその部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質（部分ペプチド）とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質（部分ペプチド）とを製造し、この両蛋白質（部分ペプチド）を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質（部分ペプチド）を得ることができる。この粗蛋白質（部分ペプチド）は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質（部分ペプチド）のアミド体を得ることができる。

蛋白質またはその部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質（部分ペプチド）のアミド体と同様にして、所望の蛋白質（部分ペプチド）のエステル体を得ることができる。

25 本発明の部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有

する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①から⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. BodanszkyおよびM. A. Ondetti、ペプチド シンセ
5 シス

(Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

10 ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善 (株) (1975年)

④矢島治明および榊原俊平、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV、205、
(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラ
15 ラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組合せて本発明の蛋白質またはその部分ペプチドを単離精製することができる。上記方法で得られる該蛋白質またはその部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

20

本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、前述した本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリーより自体公知の方法により単離されたもの、合成DNAのいずれでもよい。
25

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNA画分またはmRNA画分を調製したものをを用いて、直接Reverse Transcriptase Polymerase Cha

i n R e a c t i o n (以下、R T - P C R法と略称する)によって単離することもできる。

本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列を含有するDNA、または②配列番号：7
5 または配列番号：8で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と同質の生理活性、例えば、受容体親和性、シグナル情報伝達能などの活性、臓器発現分布の特異性などを有する蛋白質をコードするDNAであればいずれのものでもよい。

10 配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

15 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (M o l e c u l a r C l o n i n g) 2nd (J. S a m b r o o k e t a l. , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b. P r e s s , 1 9 8 9) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリンジェント
20 な条件に従って行うことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19から40mM、好ましくは約19から20mMで、温度が約50から70℃、好ましくは約60から65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで、
25 温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：5または配列番号：6のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分

ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリーより自体公知の方法により単離されたもの、合成DNAのいずれでもよい。

- 5 本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列を含有するDNA、または②配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と同質の活性を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

- 15 本発明の蛋白質またはその部分ペプチド(以下、本発明の蛋白質と略記する)をコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明の蛋白質の部分配列をコードする塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNA、また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリーより自体公知の方法により単離されたものを本発明の蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片
- 20 もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって単離することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et. al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

25 DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutantTM-G(宝酒造(株))、MutantTM-K(宝酒造(株))などを用いて、Gupped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいは

それらに準じる方法に従って行うことができる。

クローン化された本発明の蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明の蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明の蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応

して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母であ

る場合は、pH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合には、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

5 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）などが
10 挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子を含有する形質転換体をチミジンを含まない培地によっても選択することができる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の蛋白質のN末端側に付加することもできる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクター α ・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場
15 合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明の蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

25 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*）, 60巻, 160（1968）〕,

JM103 [ヌクレックアシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981), JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517 (1978)], HB101
5 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440 (1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (Bacillus Subtilis) MI114 [ジーン, 24巻, 255 (1983)], 20
10 7-221 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC
15 2036、サッカロマイセス ピキア パストリス (Saccharomyces picjia pastoris) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf
20 細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf
25 細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (in vivo), 13, 213-217, 1977) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr⁻ CHO細胞), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

5 エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行うことができる。

10 バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics) 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行うことができる。

15 酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行うことができる。

20 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行うことができる。

25 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新 細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行うことができる。

このようにして、蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母抽出物、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5から8が望ましい。

- 10 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクス
ペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of
Experiments in Molecular Genetics), 4
31-433, Cold Spring Harbor Laboratory,
15 New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効
率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を
加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15から43℃で約3から24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 20 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30から40℃で約6から24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 25 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、
プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシ
ズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. US
A), 77巻, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD
培地〔Bitter, G. A. らプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・
アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. N
atl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)〕が挙

げられる。培地のpHは約5から8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃から35℃で約24から72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195巻, 788 (1962)) に非動化した10%
5 ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2から6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3から5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約
10 5から20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6から8であるのが好ましい。培養は通常約30℃から40℃で約15から60時
15 間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。
20

以上のようにして、本発明の蛋白質を培養培地中あるいは形質転換体中に生成せしめることができる。

上記培養物から本発明の蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことができる。

25 本発明の蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX

ー 1 0 0 (商品名)などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えばトリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明の蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩(以下、本発明の蛋白

質と略記する) に対する抗体は、本発明の蛋白質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

[モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

5 本発明の蛋白質は、温血動物に対して投与することにより抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2から6週毎に1回ずつ、計2から10
10 回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2から5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞
15 と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化蛋白質と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法[ネイチャー(Nature), 256, 495(1975)]に従い実
20 施できる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1から20:1程度
25 であり、PEG(好ましくはPEG1000からPEG6000)が10から80%程度の濃度で添加され、20から40℃、好ましくは30から37℃で1から10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

抗蛋白質抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用

できるが、例えば、蛋白質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例えば、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテイン A を加え、固相に結合した抗蛋白質モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテイン A を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した該蛋白質を加え、固相に結合した抗蛋白質モノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

抗蛋白質モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常 H A T（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行うことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。例えば、1 から 20 %、好ましくは 10 から 20 % の牛胎児血清を含む R P M I 1640 培地、1 から 10 % の牛胎児血清を含む G I T 培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（S F M-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常 20 から 40 °C、好ましくは約 37 °C である。培養時間は、通常 5 日から 3 週間、好ましくは 1 週間から 2 週間である。培養は、通常 5 % 炭酸ガス下で行うことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗蛋白質抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

抗蛋白質モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例えば、D E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテイン A あるいはプロテイン G などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行うことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に

従って製造することができる。例えば、免疫抗原（蛋白質抗原）とキャリアー蛋白質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明の蛋白質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造できる。

- 5 温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニンなどを重量比でハプテン
10 1に対し、約0.1から20、好ましくは約1から5の割合でカップルさせる方法が用いられる。

- また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いら
15 れる。

- 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2から6週毎に1回ずつ、計約3から10回程度行われ
20 る。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

- 抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うこ
25 とができる。

本発明の蛋白質または部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAに実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明の蛋

白質または部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの塩基配列またはその一部の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有し、該蛋白質または部分ペプチドの発現を抑制し得る作用を有するオリゴヌクレオチドまたはその誘導体であれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

- 5 該DNAまたはmRNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、該DNAまたはmRNAに相補的な塩基配列（すなわち、該DNAまたはmRNAの相補鎖）の全塩基配列または部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相
10 同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAまたはmRNAの相補鎖の全塩基配列のうち、本発明の蛋白質などのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することが
15 できる。

- 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質と略記する場合がある）、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明の蛋白質
20 に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）およびアンチセンスDNAは、①本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定方法、②組換え型蛋白質の発現系の構築、③two-hybrid法を用いたアッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、④構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較に基づいたドラッグデザインの実施、⑤遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬として用いることができ、また、
25 ⑥遺伝子治療等の薬物として用いることができる。

特に、two-hybrid法を用いた本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の取得、さらに、本発明の蛋白質とアクチビン受容体、取得した他の受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を用いた結合アッセイ系によって、ヒトな

どの温血動物に特異的な情報伝達系の促進薬または阻害薬をスクリーニングすることができ、該促進薬または阻害薬を各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができ、以下により具体的に説明する。

5 (1) 本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定方法

本発明の蛋白質は、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明の蛋白質と相互作用する結合蛋白質をスクリーニングすることを特徴とする本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定方法
10 を提供する。

具体的には、本発明の結合蛋白質の決定方法は、宿主細胞発現ベクター上に、
①転写因子のDNA結合領域に本発明の蛋白質を融合させたベクターと②被
験蛋白質と転写活性化領域との融合ライブラリーとを、該転写因子結合領域を
プロモーター上に保持しているレポーター遺伝子を持つ宿主細胞に導入し、2
15 種の蛋白の結合により上昇するレポーター遺伝子の発現量の変化により、該蛋白質と相互作用する蛋白質またはその塩を決定する方法である。

本発明の結合蛋白質決定方法においては、本発明の蛋白質と被験蛋白質との相互作用を特定のレポーター遺伝子の発現に変換することにより検出する t
w o - h y b r i d 法を用いることを特徴とする。

20 本発明の結合蛋白質決定方法の具体的な説明を以下にする。

まず、結合蛋白質決定方法に用いる本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、本発明の配列番号：5 または配列番号：6 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、温血動物(例、ヒトなど)のゲノムDNA、温血動物(例、ヒトなど)のゲノムDNAライブラリー、温血動物(例、ヒトなど)の組織・細胞由来のcDNA、温血動物(例、ヒトなど)の組織・細胞由来のcDNAライブラリーより自体公知の方法により単離されたDNA、合成または半合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファ
25

ージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどのいずれであってもよい。一方、組織・細胞よりmRNA画分を調製したものを用いて直接RT-PCR法によって単離することもでき、あるいは、部分的な塩基配列をそれぞれ化学的に合成し、それらを連結させることによって製造することもできる。

- 5 スクリーニングする被験蛋白質ライブラリーとしては、市販の各種動物の種々臓器由来のcDNAライブラリー(Clon tech社製 MATCHMAKER cDNAなど)などが用いられる。

DNA結合領域と被験蛋白質の融合蛋白質を発現させるベクターとしては、pAS2-1、pGBT9、pKAD-09、pSD09、pEG202、p
10 BTM116などが用いられる。

転写因子の活性化領域と蛋白質の融合蛋白質を発現させるベクターとしては、pGAD424、pACT2、pKT10Gal-VP、pJG4-5、pVP16などが用いられる。

転写因子としては、GAL4、LexA、SRFなどが用いられる。

- 15 レポーター遺伝子としては、b-ガラクトシダーゼ遺伝子(LacZ)、ヒスチジン遺伝子(HIS3)、ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチル転移酵素遺伝子などが用いられる。

宿主細胞としては、酵母(Saccharomyces cerevisiae)、大腸菌などが用いられ、その中でもCG-1945、Y190、Y1
20 87、HF7c、SFY526、L40、EGY48、HIS/L1、62L酵母株などが用いられる。

- 具体的には、該蛋白質に結合する蛋白質の決定方法は、まず該蛋白質をコードする塩基配列を含むDNA断片とプラスミド(例えば、pAS2-1)上のDNA結合領域をコードする塩基配列を含むDNA断片と同じ続き枠に結合
25 したプラスミド、およびプラスミド(例えば、pACT2)上の転写因子(例えば、GAL4)の転写活性化領域をコードする塩基配列を含むDNA断片と結合し、融合蛋白質の形で発現されるcDNAライブラリーを、例えば、モレキュラー クローニング(Molecular Cloning)2nd (J. Sambrook et. al., Cold Spring Harbor La

b. Press, 1989)に記載の方法などに従って作成することができる。

上記の2種のプラスミドを宿主細胞(例えば、サッカロマイセス セレビシエ Y190)に導入するには、これらで同時に形質転換してもよいし、または一方のプラスミドを先に導入した後に他方を逐次導入してもよく、例えば、

5 メツソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 75巻, 1929 (1978)などに記載の方法に従って行うことができる。

10 形質転換体のレポーター遺伝子の発現、レポーター酵素の発色物質、蛍光物質の生成量あるいは発光量等に変換して検出できる。より具体的には、宿主細胞が酵母の場合、レポーター遺伝子の発現(例えば、 β -ガラクトシダーゼ活性)は、レプリカプレート法またはフィルター法を、好ましくはフィルター法を用いて青/白の呈色スクリーニングにより検出することができる。

15 フィルター法で呈色(例えば、青色)したコロニーは、例えば、ア・プラクティカル・アプローチ (A Practical Approach) (Bartel, P. L. et al., Oxford University Press, Oxford; 153-179, 1993a)などに記載の方法に従い処理されることにより、ポジティブクローンの単一コロニーを分離することが

20 できる。

分離した単一の形質転換体より、例えば、ジーン (Gene), 57巻, 267 (1987)、バイオ・テクニクス (Bio Techniques), 14巻, 552 (1993)などに記載の方法に従い、プラスミドDNAを回収し、そのDNAの塩基配列の決定により、本発明の蛋白質に対する受容体を

25 決定することができる。

また、市販のキット、例えば、MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid Systems (Clontech社製)などを使用しても本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を決定することができ、その場合は、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

(2) 本発明の蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記(1)の方法において、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質が明らかになれば、該結合蛋白質の発現部位および該結合蛋白質を介した本発明の蛋白質が有する作用などを明らかにすることができる。これらの知見を基に、本発明の蛋白質をコードするDNAは、該結合蛋白質を介した疾患の予防・治療剤として使用することができる。また、本発明の蛋白質はアクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子への結合活性を示すことより、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を介した疾患の予防・治療剤として使用することができる。

例えば、本発明の蛋白質の遺伝子が脳内に特異的に発現することから、該結合蛋白質、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患などを発症している患者がいる場合に(イ)本発明の蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ)脳細胞などに本発明の蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該脳細胞を該患者に移植することなどによって、該患者の脳細胞における本発明の蛋白質の作用を十分に発揮させることができる。従って、本発明の蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明の蛋白質の結合蛋白質、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を介した疾患の予防・治療剤として使用することができる。

本発明のDNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などと同時に一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和するこ

とによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80（商品名）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。該DNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 Kgとして）においては、一日につき約0.1から100 mg、好ましくは約1.0から50 mg、より好ましくは約1.0から

- 20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（60Kgとして）においては、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60Kg
- 5 当たりに換算した量を投与することができる。

（3）本発明の蛋白質とその結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物のスクリーニング方法

- 10 本発明の蛋白質またはその塩を用いるか、または組換え型結合蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いた蛋白質競合的結合アッセイ系を用いることによって本発明の蛋白質とその結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。さらに、本発明の
- 15 蛋白質をコードするDNAを導入した形質転換体での2種の蛋白質の相互作用によるレポーター遺伝子の発現系（two-hybrid法）を用いることによって、本発明の蛋白質とその結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。
- 20 このような化合物には、結合蛋白質を介して細胞刺激活性（例えば、増殖促進、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など）を有する化合物（いわゆるアゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆるアンタゴニスト）などが含まれる。

- 本発明の蛋白質に結合する蛋白質としては、上記（1）で決定された蛋白質、
- 25 アクチビン受容体、前述したアクチビン細胞内情報伝達分子（特に、Smad3などのSmad）などが用いられる。以下、これらを本発明の蛋白質に対する結合蛋白質と略記する場合がある。

すなわち、本発明は、

- 1）（i）本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本発明の蛋白質またはその

塩を接触させた場合と (ii) 本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本発明の蛋白質またはその塩および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうこと、または、

- 2) (i) 本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質をコードする DNA を導入した形質転換体と (ii) 試験化合物を接触させた場合の該形質転換体との比較を行なうことを特徴とする本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、

- 1) (i) 本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本発明の蛋白質またはその塩を接触させた場合と (ii) 本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本発明の蛋白質またはその塩および試験化合物を接触させた場合における、例えば、本発明の蛋白質の結合蛋白質に対する、該蛋白質またはその塩の結合量、細胞刺激活性などを測定して比較すること、または、
- 2) (i) 本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質をコードする DNA を導入した形質転換体と (ii) 試験化合物を接触させた該形質転換体における、例えば、呈色度などによるレポーター遺伝子の発現の程度を比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

- ① 標識した本発明の蛋白質またはその塩を、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に接触させた場合と、標識した本発明の蛋白質またはその塩および試験化合物を本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に接触させた場合における、標識した本発明の蛋白質またはその塩の該結合蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ② 本発明の蛋白質に対する結合蛋白質が膜結合型の蛋白質（例えば、膜貫通型受容体、チャンネル等）の場合、標識した本発明の蛋白質またはその塩を、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した本発明の蛋白質またはその塩および試験化合物を本

発明の蛋白質に対する結合蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した本発明の蛋白質またはその塩の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識した本発明の蛋白質またはその塩を、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞内に発現した結合蛋白質に接触させた場合と、標識した本発明の蛋白質またはその塩および試験化合物を本発明の蛋白質に対する結合蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞内に発現した結合蛋白質に接触させた場合における、標識した本発明の蛋白質またはその塩の該結合蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

④本発明の蛋白質の遺伝子を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の遺伝子を発現せしめるプラスミドとを導入された宿主細胞と、該宿主細胞を試験化合物に接触させた場合における、該宿主細胞内での本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の相互作用により発現が制御されている遺伝子群の発現、あるいは生理学的反応（例えば、該結合蛋白質がアクチビン受容体の場合、FSHの分泌等）を比較することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる結合蛋白質としては、該結合蛋白質またはそれらの塩を含有するものであれば何れのものであってもよいが、温血動物の臓器の抽出物が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、遺伝子組換え技術を用いて大量発現させた結合蛋白質またはその塩が適している。

結合蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、例えば、該蛋白質

をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではなく、例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。該結合蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、
5 それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒト・ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現した結合蛋白質の量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献
10 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

15 したがって、本発明のスクリーニング方法において、結合蛋白質またはその塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した結合蛋白質またはその塩であってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質が膜結合蛋白質の場合、それを含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

20 本発明のスクリーニング方法において、結合蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

結合蛋白質を含有する細胞としては、結合蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが
25 挙げられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波によ

る破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500から3000rpm）で短時間（通常、約1から10分）遠心し、上清をさらに高速（15000から30000rpm）で通常30分から2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した結合蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該結合蛋白質を含有する細胞や膜画分中の結合蛋白質の量は、1細胞当たり 10^2 から 10^8 分子であるのが好ましく、 10^5 から 10^7 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど細胞抽出物あるいは膜画分当たりの本発明の蛋白質との結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害する化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当な結合蛋白質画分と、標識した本発明の蛋白質が必要である。該結合蛋白質画分としては、天然型の結合蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型結合蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、本発明の蛋白質に対する同等の結合活性などを示す。

標識した本発明の蛋白質としては、標識した本発明の蛋白質、標識した本発明の蛋白質アナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ など標識された本発明の蛋白質などを利用することができる。

具体的には、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うには、まず、該結合蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより結合蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH4から10（望ましくはpH6から8）のリン酸バッファー、トリスー塩酸バッファーなどの

本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80（商品名）（花王-アトラス社製）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。

- 5 さらに、プロテアーゼによる結合蛋白質や本発明の蛋白質の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01から10mlの該結合蛋白質溶液に、一定量（5000から500000cpm）の標識した本発明の蛋白質を添加し、同時に 10^{-4} から 10^{-10} Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明の蛋白質を加えた反応チューブも用意する。反応は0から50℃、望ましくは4から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（B0）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B0-NSB）を100%とした時、特異的結合量（B-NSB）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができ、一方、特異的結合量（B-NSB）が例えば150%以上になる試験化合物を結合促進能力のある候補化合物として選択することができる。
- 10
15
20

- 本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物スクリーニングする前記の④の方法を実施するためには、本発明の蛋白質の遺伝子を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の遺伝子を発現せしめるプラスミドとを導入された宿主細胞内での、本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の相互作用により発現が制御されている遺伝子群の発現、あるいは生理学的反応（例えば、該結合蛋白質がアクチビン受容体の場合、FSHの分泌等）を公知の方法を用いて測定することができる。具体的には、宿主細胞が酵母の場合、まず、酵母細胞に本発明の蛋白質と転写制御因子のDNA結合領域とを融合させた蛋白
- 25

質を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に対する結合蛋白質と転写制御因子の活性化領域とを融合させた蛋白質を発現せしめるプラスミドとを導入した形質転換体を前述と同様の方法にて作製する。スクリーニングを行なうにあたっては、この形質転換体を 10^{-4} から 10^{-10} M の試験化合物を含む寒

5 天培地上で 30°C で 2 から 4 日間培養する。寒天培地としては、トリプトファン／ロイシン／ヒスチジン欠損 SD 培地、トリプトファン／ロイシン欠損 SD 培地などが用いられる。その後、レポーター遺伝子の発現を β -ガラクトシダーゼ活性によるコロニーの呈色として検出するために、フィルター法などを用いて検出する。検出は、形質転換体が付着したフィルター上に、Z 緩衝液／X

10 -gal (Clontech 社) で湿らせたワットマン #5 フィルターまたは VWR グレード 410 フィルターを置き、 30°C で 30 分から 8 時間保温した後、フィルター上のコロニーの呈色を、試験化合物を含まないコントロールとしての形質転換体との呈色の度合いを比較する。この時、コントロールと比して、より濃い呈色を示すコロニーの培養培地に加えた試験化合物を結合促進能力のある候補化合物として、また、より薄い呈色を示すコロニーの培養培地に

15 加えた試験化合物を結合阻害能力のある候補化合物として選択することができる。また、レポーター遺伝子の発現を β -ガラクトシダーゼ活性として、基質の分解により生成する o -ニトロフェノール量を測定することにより定量することもできる。まず、形質転換体を 10^{-4} から 10^{-10} M の試験化合物を含む液体培地上で 30°C で 8 から 24 時間振盪培養する。液体培地としては、トリプトファン／ロイシン／ヒスチジン欠損 SD 培地、トリプトファン／ロイ

20 シン欠損 SD 培地などが用いられる。好ましくは一夜培養した後、培養液の一部を YPD 培地に植菌し、 OD_{600} が 0.5 から 1.0 となるように 30°C で 3 から 5 時間振盪培養する。その培養液の一部を遠心した残渣の Z 緩衝液／ β

25 -メルカプトエタノール混合物中に o -ニトロフェニルガラクトシド溶液 (Sigma 社) を加え反応させる。反応は、 0 から 50°C で、3 分から 24 時間、望ましくは、 30°C で、30 分から 15 時間行い、黄色に着色した上清の 420 nm の吸光度 (OD_{420}) を測定する。 β -ガラクトシダーゼ活性は、得られた吸光度 (OD_{420}) より以下の計算式を用いて、ミラー単位 (Miller

r u n i t) として算出する。

試験化合物を培地に添加することにより、 β -ガラクトシダーゼ活性値が約 10%以上、好ましくは約 20%以上、より好ましくは約 30%以上、最も好ましくは約 50%以上増加した場合、該試験化合物を本発明の蛋白質と本発明
5 の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を促進する能力のある候補化合物として選択することができる。一方、試験化合物を培地に添加することにより、 β -ガラクトシダーゼ活性値が約 10%以上、好ましくは約 20%以上、より好ましくは約 30%以上、最も好ましくは約 50%以上低下した場合、該試験化合物を本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害
10 する能力のある候補化合物として選択することができる。

レポーター遺伝子の発現活性を測定してスクリーニングを行なうには、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質をコードする DNA が必要である。本発明の蛋白質に対する結合蛋白質をコードする DNA としては、該 DNA を含有する DNA またはそれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA
15 NA などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

20 本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を含有する細胞、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を含有する細胞の抽出画分、あるいは本発明の蛋白質と転写制御因子の DNA 結合領域を融合
25 させた蛋白質を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に対する結合蛋白質と転写制御因子の活性化領域を融合させた蛋白質を発現せしめるプラスミドとを導入した形質転換体を含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①形質転換体

本発明の蛋白質と転写制御因子のDNA結合領域を融合した蛋白質を発現せしめるプラスミドとアクチビンIIA-N受容体蛋白質と転写制御因子の活性化領域を融合した蛋白質を発現せしめるプラスミドとを導入し、形質転換した酵母Y190株

②液体培養培地

トリプトファン／ロイシン／ヒスチジン欠損SD培地：酵母窒素源（Difco社）水溶液をオートクレーブで滅菌後、L-イソロイシン、L-バリン、L-アデニンヘミ硫酸塩、L-アルギニン塩酸塩、L-リジン塩酸塩、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-スレオニン、L-チロシン、L-ウラシルよりなるオートクレーブで滅菌し4℃で保存したドロップアウト溶液を加える。さらに、フィルターで濾過滅菌した40%デキストロース／ストック溶液（Sigma社）を加え、2%になるように調整し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

YPD培地：Difcoペプトンに酵母抽出物の水溶液をオートクレーブで滅菌後、フィルターで濾過滅菌した40%デキストロースを加え最終濃度を2%に調整し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

③緩衝液

Z緩衝液： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、KCl、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を含み、pHを7付近に調整後、オートクレーブで滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

Z緩衝液／β-メルカプトエタノール：Z緩衝液100に対してβ-メルカプトエタノールを0.27の割合で加えたもの。

④β-ガラクトシダーゼの基質

o-ニトロフェニルガラクトシド溶液（Sigma社）をZ緩衝液に溶解し、4mg/mlの濃度に調整したもので用時調製する。

⑤反応停止液

4℃で保存した1M炭酸ナトリウム溶液を用いるか、あるいは用時調製し

てもよい。

2. 測定法

- ① 10^{-3} から 10^{-10} M の試験化合物溶液を $5\mu\text{l}$ 加えた 1ml のトリプトファン／ロイシン欠損 SD 培地で酵母形質転換体を 30°C で一夜振盪培養する。
- 5 ② 培養液 0.4ml を 1.6ml の YPD 培地中に加え、 OD_{600} が 0.5 から 1.0 となるように 30°C で 3 から 5 時間振盪培養する。
- ③ 0.3ml の培養液を 14000rpm で 30 秒間遠心し、残渣を 0.3ml の Z 緩衝液に懸濁し、再度遠心後、沈殿を 0.1ml の Z 緩衝液に懸濁する。
- ④ 液体窒素にて一旦凍結後、 37°C で 30 秒から 1 分間かけて溶解する。 0.7ml の Z 緩衝液／ β -メルカプトエタノール混液と 0.16ml の α -ニトロフェニルガラクトシド溶液を加え、 30°C で溶液が黄色になるまで保温し、この後 0.4ml の 1M 炭酸ナトリウム溶液を加える。
- 10 ⑤ 14000rpm で 10 分間遠心し、その上清の 420nm における吸光度を測定し、 β -ガラクトシダーゼ活性をミラー単位 (Miller unit) として次の式〔数 1〕で求める。

〔数 1〕

$$\beta\text{-ガラクトシダーゼ活性} = 1000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

OD_{420} : 420nm における吸光度

t : 反応時間 (分)

20

V : 反応に用いた、形質転換体の Z 緩衝液の懸濁液量 \times 希釈倍率

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明の蛋白質（なかでも 5 つの PDZ ドメインまたは（および）2 つの WW ドメインを有し、特に脳で発現し、アクチビン受容体または（および）アクチビン細胞内情報伝達分子と結合する蛋白質）と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害する化合物または促進する化合物（以下、促進化合物）である。
- 25

本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害する化合物には、①本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に結合することによって、本

発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白との結合を阻害し、それ自体が結合蛋白質を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆるアゴニスト）、②本発明の蛋白質に対する結合蛋白に結合することによって、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白との結合を阻害するが、それ
5 自体は結合蛋白質を介した細胞刺激活性を有しない化合物またはその塩（いわゆるアンタゴニスト）、③本発明の蛋白質に対する結合蛋白に結合することなく、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白との結合を阻害する化合物（以下、阻害化合物と略記）またはその塩などが含まれる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合性の
10 有無は、上記した結合活性の測定法に従って確認することができる。

結合蛋白質を介した細胞刺激活性は、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、
15 発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該アゴニストおよび促進化合物は、本発明の蛋白質が有する生理活性と同様の作用を有するか、あるいはその生理活性を増強する作用を有しているので、
20 該蛋白質活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物、特に該結合蛋白質またはアクチビン受容体に関連した神経細胞異常または脳疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん症、ハンチントン舞踏症など）の予防・治療薬として有用である。

逆に、該アンタゴニストまたは阻害化合物は、本発明の蛋白質が有する生理
25 活性を抑制することができるので、該蛋白質活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物、特に該結合蛋白質またはアクチビン受容体に関連した神経細胞異常または脳疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん症、ハンチントン舞踏症など）の予防・治療薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得ら

れる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくは、それ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。

油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清ア

ルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

5 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。

10 該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 Kgとして）においては、通常、一日につき約0.1から100 mg、好ましくは約1.0から50 mg、より好ましくは約1.0から20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で通常成人（60 Kgとして）においては、通常、一日につき約0.01から30 mg程度、好ましくは約0.1から20 mg程度、より好ましくは約0.1から10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。ヒト以外の動物の場合も、60 Kgあたりに換算した時に同等となるような量を投与することができる。

（4）本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

20 本発明の蛋白質抗体は、本発明の蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

25 （i）本発明の蛋白質等に反応する抗体と、被検液および標識化された本発明の蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明の蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法、

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法において、

一方の抗体が本発明の蛋白質等のN端部あるいはC端部を認識する抗体で、他方の抗体が配列番号：5または配列番号：6のアミノ酸配列に反応する抗体であることを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法を提供する。

5 本発明の蛋白質等を認識するモノクローナル抗体（以下、抗蛋白質抗体と称する場合がある）を用いて本発明の蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF（a b'）²、F a b'あるいはF a b画分を用いてもよい。

10 本発明の抗体を用いる本発明の蛋白質等の測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば本発明の蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、
15 特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば
20 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

25 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した抗蛋白質抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した抗蛋白質抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明の蛋白質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、
5 同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

- 10 本発明のサンドイッチ法による本発明の蛋白質等の測定法においては1次反応と2次反応に用いられる抗蛋白質抗体は本発明の蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明の蛋白質等のC端部あるいはN端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好まし
15 くは配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を認識する抗体が用いられる。

本発明の蛋白質等に対する抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

- 20 競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（F）と抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第
25 1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標

識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の蛋白質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)「Methods in Enzymology」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Selected Immunoassays (Part D))、同書Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods (Part E))、同書Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies (Part I))) (以上、アカデミックプレス社発行) など参照〕。

以上のように、本発明の蛋白質等に対する抗体を用いることによって本発明の蛋白質等を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の蛋白質等に対する抗体を用いて本発明の蛋白質等の濃度を定量することによって、例えば、本発明の蛋白質等が関与する疾病の診断を行うことができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被験体中に存在する本発明の蛋白質等を検出するために使用することができる。また、本発明の蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各画分中の本発明の蛋白質等の検出、被験細胞内における本発明の蛋白質等の挙動の分析などのために使用することができる。

10 (5) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードする遺伝子異常を検出することができるので、例えば、該DNAの突然変異あるいはmRNAの異常蓄積あるいは異常減少などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

25

(6) アンチセンスDNAを含有するDNA

本発明の蛋白質等をコードするDNAまたはmRNAに相補的に結合し、該mRNAの転写あるいは翻訳を抑制することができるアンチセンスDNAは、本発明の蛋白質等をコードする遺伝子の異常発現を抑制することができる。従

って、該アンチセンスDNAは、例えば、本発明の蛋白質等をコードする遺伝子の異常発現に起因する疾病の予防・治療剤として使用することができる。

該アンチセンスDNAを上記の予防・治療剤として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する医薬と同様にして製造することができる。例えば、
5 該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従ってヒトまたは温血動物に投与することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂食促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロ
10 ロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

15 (7) DNA転移動物の作製

本発明は、外来性の本発明の蛋白質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 20 (i) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
(ii) 非ヒト哺乳動物がげっ歯類動物である第(i)記載の非ヒト哺乳動物、
(iii) げっ歯類動物がマウスである第(ii)記載の非ヒト哺乳動物、
(iv) げっ歯類動物がラットである第(ii)記載の非ヒト哺乳動物、および
(v) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。
25

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でか

つ一般に8細胞期以前)に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、
5 組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ラット、マウス、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌなどが用いられる。なかでも、
10 病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なげっ歯動物、とりわけマウス(例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など)またはラット(例えば、Wister, SDなど)などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明の蛋白質をコード
20 するDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異(例えば、突然変異など)が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明の蛋白質を発現させる遺伝子を含有するDNAを意味し、例えば、正常な本発明の蛋白質の機能を抑制する蛋白質を発現させる遺伝子を含有するDNAなどが用いられる。
25

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明の蛋白質をコードするDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモ-

ターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させる各種プロモーターの下流に、本発明のDNAを結合したDNAコンストラクト（例えば、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

該コンストラクトを保持するベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記DNA発現調節を行うプロモーターとしては、例えば、ウイルス（例えば、シミアヌイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のものとしては、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存蛋白質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロテイナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ、ポリペプチド鎖延長因子

1 α (EF-1 α)、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1
および2、ミエリン基礎蛋白質、チオグロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、
H鎖可変部(VNP)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、
トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシン
5 などのプロモーターなどが用いられるが、好ましくは全身で高発現することが
可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1 α
(EF-1 α)のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーター
などを用いることができる。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするmRNAの転写を
10 終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好まし
く、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いる
ことができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが
用いられる。

その他、目的DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシング
15 シグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモー
ター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'
下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明の蛋白質の翻訳領域は、各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、
ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス、ヒトなど）由来の肝臓、腎
20 臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来ゲノムDNAおよび市販の各種ゲノムDNA
ライブラリーよりゲノムDNAのすべてあるいは一部として、または肝臓、腎
臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補
DNAを原料として、自体公知の方法で取得することができる。また、外来性
の異常DNAは、本発明の蛋白質の変異を起因とする疾病を発症した上記の細
25 胞または組織より得ることができる。また、上記の細胞または組織より得られ
た正常な蛋白質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作
製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前
記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる

通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明のDNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配によりDNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫がすべてその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを過剰に有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴット動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明の蛋白質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能亢進症や、本発明の蛋白質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行うことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、本発明の蛋白質の増加症状を有することから、本発明の蛋白質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外

来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することができる。さらに、目的とする外来性DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常の遺伝子工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫がすべてその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の異常DNAを有することを意味する。DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明の蛋白質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患の治療方法の検討を行うことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症における本発明の異常蛋白質による正常蛋白質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、本発明の蛋白質の増加症状を有することから、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、

②本発明のDNA転移哺乳動物の組織中のmRNAを直接分析するか、発現し

た蛋白質組織を分析することによる、本発明の蛋白質により特異的に発現あるいは活性化する蛋白質との関連性についての解析、

③上記①記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるあるいは抑制するような薬剤のスクリーニング、および

- 5 ④本発明の変異蛋白質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症を含む、本発明の蛋白質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明の蛋白質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行うことが可能である。さらに、本発明の蛋白質産生細胞の特定化、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明の蛋白質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症を含む、本発明の蛋白質に関連する疾患の治療薬の開発を行うために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明の蛋白質が関連する疾患の遺伝子治療法を検討、開発することが可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、
25 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
5	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
10	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
15	EIA	: エンザイムイムノアッセイ
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
20	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
25	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン

	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
5	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l	: ピログルタミン酸
	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
10	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

15	T o s	: p-トルエンスルホニル
	C H O	: ホルミル
	B z l	: ベンジル
	C l ₂ B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
20	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェノール
25	T r t	: トリチル
	B u m	: t-ブトキシメチル
	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	H O O B t	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-

1, 2, 3-ベンゾトリアジン

HONB : 1-ヒドロキシー-5-ノルボルネン-2, 3-ジカル
ボジイミド

DCC : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

5 本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

two-hybrid法に用いるbaitプラスミドとしてのアクチビン
IIA-N受容体蛋白質の細胞内ドメインをコードするDNAフラグメントの
塩基配列を示す。

10 〔配列番号：2〕

ノーザンハイブリダイゼーションに用いるプローブとしてのDNA断片の
塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

15 ノーザンハイブリダイゼーションに用いるプローブとしてのDNA断片の
塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

ノーザンハイブリダイゼーションに用いるプローブとしてのDNA断片の
塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

20 本発明の蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕

本発明の蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

25 本発明の配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする
cDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

本発明の配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする
cDNAの塩基配列を示す。

後述の実施例1で得られた形質転換体エシャリヒア コリ (Escherichia

coli) DH5 α /pBSYN3-6は、平成10年12月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-6592として、平成10年11月18日から財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16221として寄託されている。

- 5 以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれ
に限定されるものではない。なお、酵母を用いたtwo-hybrid法の操
作法は市販のキット(Clontech社製)に添付の説明書に記載されてい
る方法に、また、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニ
ング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

10

実施例1 本発明の蛋白質をコードするcDNAのクローニング

(1) two-hybrid法によるアクチビンIIA-N受容体蛋白質と相互
作用する蛋白質のスクリーニング

- 15 以下の、cDNAライブラリーからアクチビンIIA-N受容体蛋白質と相互
作用する蛋白質のスクリーニングには、キットとしてMATCHMAKERTM
Two-Hybrid System 2 (Cat. No. K1604-1: Clontech社)を用いた。

- 上記方法に従い、DNA結合用ベクターpAS2-1のEcoRI部位と
BamHI部位を適切な制限酵素で切断し、アルカリフォスファターゼ処理
20 した後精製した。その後、配列番号:1で表されるアクチビンIIA-N受容体
蛋白質の細胞内ドメインをコードするDNAフラグメントをライゲーション
し、目的とするGAL4 DNA結合ドメインとアクチビンIIA-N受容体細
胞内ドメイン全体を融合蛋白質として発現するプラスミド(pAS-IIA-N)
を得た。GAL4転写活性化領域融合ライブラリープラスミドとしては、
25 市販のマウス脳MATCHMAKER cDNA library(Clontech社)を用いた。

酵母菌株Y190の単一コロニー(直径2から3mm)を20mlのトリプ
トファン欠損SD培地に植菌し、18時間30℃で振盪培養した。この培養液
の10mlを300mlのYPD培地にOD₆₀₀=0.2から0.3なるよう

に植え、30℃で3時間振盪培養した。培養液を滅菌した遠心管に移し、1000×gで5分間室温で遠心した。上清を捨て、細胞を25mlの滅菌水に懸濁し、再度、1000×gで5分間室温で遠心した。上清を捨て、細胞を1.5mlのTE緩衝液(0.01M Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) / 0.1M酢酸リチウム溶液(pH 7.5)の混合液に懸濁して次の形質転換に用いた。

先に作製した10μgのプラスミド(pAS-IIA-N)と2mgのニシン精巢キャリアーDNA(Clontech社)に上記で作製した細胞懸濁液1mlを加え、よく混合した。さらに、6mlのPEG(40%PEG 4000) / TE緩衝液 / 0.1M酢酸リチウム溶液の混合液を加え、ボルテックスミキサーで混合した。30℃、200rpmで30分間振盪後、700μlのDMSO(最終濃度10%)を加えて穏やかに攪拌した。その後、時々振りながら、42℃で15分間加熱し、容器を氷冷後、1000×gで5分間遠心した。上清を捨て、細胞を0.5mlのTE緩衝液に懸濁した。得られた細胞懸濁液100μlをトリプトファン欠損SD培地上にスプレッドし、30℃で4日間培養し、前記プラスミドを安定に保持する株を得た。続いて、GAL4転写活性化領域融合ライブラリープラスミドも同様の方法にて前記酵母株に導入した。得られた形質転換体0.2mlをトリプトファン / ロイシン / ヒスチジン欠損SD培地上にまき、30℃で8日間培養した後、His⁺コロニーをトリプトファン / ロイシン / ヒスチジン欠損寒天プレート上にストリークした。

シャーレに5mlのZ緩衝液(Na₂HPO₄・7H₂O, NaH₂PO₄・H₂O, KCl, MgSO₄・7H₂O, pH 7) / X-gal溶液(5-ブromo-4-クロロ-3インドリル-β-D-ガラクトシドの2%DMF溶液) / β-メルカプトエタノール混合液を入れ、滅菌したワットマン#5フィルターを湿らせた。別のフィルターを前記形質転換体コロニーがある寒天プレート上に置いた後、このフィルターを取り上げ、コロニー面を上にして液体窒素で凍結させた。液体窒素中からフィルターを取り出し、室温で融解した後、先の湿らせたフィルター上にコロニー面を上にして置いた。シャーレの蓋を閉めて3

0℃で1時間保温し、青くなった約100個のポジティブコロニーを分離した。得られたそれぞれのポジティブクローンを3mlのロイシン欠損SD液体培地に植え、2日間培養した後、この培養液を10000倍に希釈し、ロイシン欠損SDプレートにまき、30℃で3日間保温した。20から30個のコロニーを滅菌した楊枝で拾い、トリプトファン／ロイシン欠損SDプレートとロイシン欠損SDプレートにレプリカした。ここで、先のポジティブコロニーよりトリプトファン栄養要求性を示すコロニーを選択し、そのβ-ガラクトシダーゼ活性の検定を行い、さらに活性を示さない2個のコロニーを選択した。

得られた真のポジティブコロニーを2mlのYPD液体培地に植え、30℃で一夜培養した。培養液を5秒間室温で遠心し、上清を捨てた後、0.2mlの酵母溶解液(2%トリトンX-100, 1%SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA)を加え、懸濁させた。0.2mlのフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール(25:24:1)と酸で洗ったガラスビーズを加え、2分間ボルテックスミキサーで攪拌した。14000rpmで5分間室温で遠心した後、分離した上清に1/10量の3M 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.2)と2.5倍量のエタノールを加えた。得られた沈殿物を70%エタノールで洗浄した後、20μlの滅菌水に溶解した。このうちの1μlを大腸菌HB101株にエレクトロポレーション法により導入した後、通常のミニプレップ法でプラスミドDNAを精製し、目的とするcDNA (YN3)を得た。

さらに、YN3の塩基配列の全コード領域を含む完全長cDNAを得るために、得られたYN3のインサート全長を、ランダムプライム法により³²Pで標識した。この標識されたYN3をプローブとして用い、マウス脳 Lambda cDNA library (Lambda ZAPIIベクター: Stratagene社)を通常のプラークハイブリダイゼーションでスクリーニングした。得られたクローンのインサート全長をさらにプローブとして用い、同様のスクリーニングを繰り返し、本発明の蛋白質の全コード領域を含む最長のインサート全長を持つと考えられるものを得た。得られた陽性ファージの一つを、Stratagene社の方法に従い、ファージミド (pBlue scr

i p t SK) (−) ベクター) に変換し、その塩基配列を決定した。本発明の蛋白質の全長 cDNA (YN3-6) は 5156 bp で、配列番号: 5 で表される 1161 個のアミノ酸からなるポリペプチド [図 1 ~ 図 11] または配列番号: 6 で表される 1112 個のアミノ酸からなるポリペプチド [図 12 および図 22] をコードしていた。

配列番号: 5 または配列番号: 6 で表されるアミノ酸からなるポリペプチドをコードする全長 cDNA (YN3-6) を含むプラスミド pBSYN3-6 を大腸菌 DH5 α に形質転換し、形質転換体: 大腸菌 DH5 α / pBSYN3-6 を得た。

10 実施例 2 マウスの各種臓器由来 poly (A) ⁺RNA を用いたノーザンハイブリダイゼーション法による発現の検出

YN3-6 のインサート内の、配列番号: 2、配列番号: 3 および配列番号: 4 で表される DNA 断片を、DIG-PCR プローブ合成キット (Boehringer 社) を用いジゴキシゲニンで標識し、プローブとして用いた。

15 また、Balb/c マウスより脳、肝臓、脾臓、胚、腎臓、心臓、精巣、卵巣、骨格筋を摘出し、TRIzol 試薬 (GIBCO BRL 社) により total RNA を抽出した。その後、PolyAT tract mRNA Isolation System (Promega 社) を用いて、poly (A) ⁺RNA を精製した。

20 各 poly (A) ⁺RNA を 1 μ g づつ用い、ホルマリンゲル法により 1% アガロースゲル電気泳動を行い、プロッティング装置 (Amersham-Pharmacia 社) を用いたバキュームプロッティング法により、Hybond N (Amersham-Pharmacia 社) にプロットした。これを先に作製したプローブ DNA の各 5 ng/ml を含むハイブリダイゼーション緩衝液 (5 \times SSC, 0.1% N-lauroyl sarcosine, 0.02% SDS, 0.5% blocking reagent (Boehringer 社), 100 μ g/ml サケ精巣 DNA) にて、65 $^{\circ}$ C で一夜保温した。その後、0.1 \times SSC および 0.1% SDS を用い、65 $^{\circ}$ C、20 分で 3 回洗浄した。さらに、アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体

(Boehringer社)を含む溶液(0.1M Tris-HCl pH 7.5, 0.15M NaCl, 150mU/ml抗体)中で保持した後、0.1M Tris-HCl (pH 7.5)、0.15M NaClおよび0.1% Tween 20を用い、15分で3回洗浄した。最後に、Lumi-Phos 530 (和光純薬工業社製)を基質とした化学発光を行い、X線フィルムに露光して検出した結果、本発明の蛋白質が特に脳で多く発現していることが確認された[図23]。

実施例3 ARIP1とSmad3との相互作用

GAL4 DNA結合ドメインに融合した全長Smad3 DNAおよびVP16活性化ドメインに融合した本発明蛋白質(ARIP1)を形質導入したCHO細胞において、哺乳動物ツーハイブリッドシステムでのSmad3とのARIP1と特異的相互作用を調べた。

哺乳動物ツーハイブリッドスクリーニングのためのDNAコンストラクトを以下の通り作製した。すなわち、GAL4 DNA結合ドメインとSmad3との融合蛋白質の発現にはプラスミドpBINDを用い、ヒトSmad3をコードする全長cDNAをpBINDにライゲーションしpBIND-Smad3を作成した。また、VP16活性化ドメインとARIP1との融合蛋白質の発現にはプラスミドpACTを用いた。PCRにより得られたフラグメントを、ARIP1をコードする全長cDNAの部分塩基配列(1187から4446番目)を持つプラスミドpBS-ARIP1-shortから調製したフラグメントにライゲーションすることにより作製したARIP1をコードする全長cDNAの部分塩基配列(923から4446番目)を有するcDNAフラグメントをpACTにサブクローニングし、pACT-ARIP1を作製した。

哺乳動物ツーハイブリッドアッセイには、キットとしてCheckMate Mammalian Two-Hybrid System(プロメガ社)を用い、そのプロトコールに従い実施した。上記で得られたプラスミドpBIND-Smad3およびpACT-ARIP1、サイトメガロウイルスプロモーター由来 β gal (CMV- β gal)ならびにGAL4応答プロモーターの

制御下でルシフェラーゼ遺伝子を誘導するレポータープラスミド pG5luc を CHO 細胞に導入した。CHO 細胞中での Smad3 と ARIP1 との相互作用の強さはルシフェラーゼ遺伝子により発現するルシフェラーゼの活性を指標とした。そのルシフェラーゼ活性を β ガラクトシダーゼ活性と同様に自
5 体公知の方法（エンドクリノロジー（Endocrinology），136，
5493-5503（1995））で測定した結果、本発明蛋白質（ARIP
1）は、哺乳動物細胞においてアクチビン受容体 IIA と同様に、Smad3 と
の直接的な相互作用を示した〔図24〕。

10 産業上の利用可能性

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質と略記する場合がある）、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードする DNA（以下、本発明の DNA と略記する場合がある）、本発明の蛋白質
15 に対する抗体およびアンチセンス DNA は、①本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定、②組換え型蛋白質の発現系の構築、③発現系を用いた結合アッセイ系および two-hybrid 法を用いたアッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、④構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較に基づいたドラッグデザインの実施、⑤遺伝子診断におけるプローブ、PCR
20 プライマーの作成等における試薬として用いることができ、また、⑥遺伝子治療等の薬物として用いることができる。特に、本発明の蛋白質の構造・性質の解明は、これらの系に作用するユニークな医薬品の開発につながる。

請求の範囲

1. 配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩。
- 5 2. 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩。
3. PDZドメインおよびWWドメインを有し、脳に特異的に発現し、アクチビン受容体または（および）アクチビン細胞内情報伝達分子に対する結合能を有する請求項1項または請求項2記載の蛋白質。
- 10 4. アクチビン細胞内情報伝達分子がSmad3である請求項3記載の蛋白質。
5. 5つのPDZドメインおよび2つのWWドメインを有し、脳に特異的に発現し、アクチビン受容体およびSmad3に対する結合能を有する請求項1または請求項2記載の蛋白質。
6. 請求項1記載の蛋白質の部分ペプチド、請求項2記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。
- 15 7. 請求項1記載の蛋白質または請求項2記載の蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有する組換えDNA。
8. 配列番号：7で表される塩基配列、配列番号：8で表される塩基配列またはそれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する請求項7記載のDNA。
- 20 9. 請求項6記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する組換えDNA。
10. 請求項7記載のDNAを含有する組換えベクター。
11. 請求項10記載の組換えベクターを保持する形質転換体。
- 25 12. 請求項11記載の形質転換体を培養し、請求項1記載の蛋白質または請求項2記載の蛋白質を生成・蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質またはその塩の製造方法。
13. 請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項6記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

1 4. 請求項 1 3 記載の抗体に対して、請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載
の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有する被検液および
標識化された請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の
部分ペプチドまたはその塩を競合的に反応させることを特徴とする請求項 1
5 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはそ
の塩の定量方法。

1 5. 請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペ
プチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項 1 記載の蛋白質、請求
項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩と結合する蛋白
10 質の決定方法。

1 6. ①転写因子の DNA 結合領域に請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の
蛋白質または請求項 6 記載の部分ペプチドを融合させた発現ベクターと②被
検蛋白質をコードする遺伝子と転写活性化領域との融合ライブラリーとを、該
転写因子結合領域をプロモーター上に保持しているレポーター遺伝子を持つ
15 宿主細胞に導入し、請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質または請求
項 6 記載の部分ペプチドと被検蛋白質との結合により上昇するレポーター遺
伝子の発現量の変化を測定することを特徴とする請求項 1 5 記載の決定方法。

1 7. 請求項 1 5 記載の方法により得られる、請求項 1 記載の蛋白質、請求項
2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩と結合する蛋白質
20 またはその塩。

1 8. 請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペ
プチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項 1 記載の蛋白質、請求
項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩と、請求項 1 7
記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報
25 伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニン
グ方法。

1 9. 標識した請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載
の部分ペプチドまたはその塩をアクチビン受容体またはアクチビン細胞内情
報伝達分子に接触させた場合と、標識した請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記

載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩および試験化合物をアクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に接触させた場合における、標識した請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩のアクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩とアクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

20. 標識した請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を請求項 17 記載の蛋白質またはその塩に接触させた場合と、標識した請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質またはその塩および試験化合物を請求項 17 記載の蛋白質またはその塩に接触させた場合における、標識した請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の請求項 17 記載の蛋白質またはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩と請求項 17 記載の蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

21. 請求項 17 記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞に請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を導入した場合と、請求項 17 記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞に請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩および試験化合物を導入した場合における、請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の該細胞内における請求項 17 記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩と請求項 17 記

載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

22. 標識した請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項6記載の部分ペプチドまたはその塩を請求項17記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項6記載の部分ペプチドまたはその塩および試験化合物を請求項17記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項6記載の部分ペプチドまたはその塩の該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする標識した請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項6記載の部分ペプチドまたはその塩と請求項17記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

23. 請求項17記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞に請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質またはその塩を導入した場合と、請求項17記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を発現した細胞に請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項6記載の部分ペプチドまたはその塩および試験化合物を導入した場合における、請求項17記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項6記載の部分ペプチドまたはその塩と請求項17記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

24. ツー ハイブリッド(two-hybrid)法を用いることを特徴とす

る請求項 1 6 記載の蛋白質の決定方法または請求項 1 8 ～請求項 2 3 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

2 5. 請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩と、請求項 1 7 記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

2 6. 請求項 1 8 ～請求項 2 3 のいずれかに記載のスクリーニング方法または請求項 2 5 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載の蛋白質、請求項 2 記載の蛋白質、請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩と、請求項 1 7 記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子との結合を阻害または促進する化合物またはその塩。

2 7. 請求項 1 7 記載の蛋白質、請求項 2 6 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

2 8. アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん症またはハンチントン舞蹈症の予防・治療剤である請求項 2 7 記載の医薬。

2 9. 哺乳動物に対して請求項 1 7 記載の蛋白質、請求項 2 6 記載の化合物またはその塩を有効量投与することを特徴とする請求項 1 7 記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防・治療方法。

3 0. 請求項 1 7 記載の蛋白質もしくはその塩、アクチビン受容体またはアクチビン細胞内情報伝達分子に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防・治療剤を製造するための請求項 1 7 記載の蛋白質、請求項 2 6 記載の化合物またはその塩の使用。

☒ 1

TGCGCGCCACGACGGCGCCAGCACCTCCGAGGAGCTGACCGACCTCCACGGCGTCCCGA	60
ACACACTGCCACCGCGCGCGCGCGCGGCTCGCGCGGCACTCCCTCGCACGTCACC	120
ACGTGCGCTGCGCGCCAAACGCCCTCCCGGCGGCTTCCGGCTCTGATGCCTGAGCGAATCACA	180
GGCGAGCTCCCGGGAAGATCCCGCTCTGAGGCTCCGCCCCCGGACAGGCCCCCGCCACCC	240
TCATAGCTCTTTTCCTCAGCGGCCCCCTCCTTCCTTCGGCTCACTAGGTCAGCGCAA	300
GGTGATCCCGGAGAGCGGGGCGGGGACCGCTCCTCTGTTACTTATCGAGCGCGCGC	360
TCCCTCCCGAGCCTCACACCTCGCTTCGCCCTTTTTTTTCCACTGTCCAGGAACTGGTT	420
CCCTCCTTCCTTCCACCTGCCCTACCTTCTCCAGAGATCCGACGTGGCGATTAGAGTT	480
CTCAGCGTCACACTGACTTCTAGGCAACTAGCCTAGACTGGAGCTCGGTGTTGTGGAAAC	540
CCCCGGCAGTAGTTGAGCATCAGGCTCTTACCTTGGAGGTGGAGGGTGAGAAAGATAG	600
AGGAAGAAGGGATAAGTCAGAGGAGGGCCCTGAACAACCTAGCCCCCTCTATTGGCCTGCTTT	660
GGGTGAGCATTTCAGTGAGTGTTTAAAAAAGGGAGGGGAAACAAAAGACCTCAG	720
GAGCAGTTTGTGTGTGTCTGGCTTCAAGAGAAAAATTCTAGACATTTATGCCGGC	780
AAGACCAAGCTCAGCTAAGACTACTTCTCCCAAGAAGATAATTGTATCAGAGGATGGGT	840
TGGATCAGTACAGGTGTTGA GGA GAC GCT GAC AGA GGA CCA TGG AAA GGT GGG	895
Gly Asp Ala Asp Arg Gly Pro Trp Lys Gly Gly	11



AGA GGA CGC GCG GCT CCT GGG CTT CCT CTG AGC TCA GCT CCA GGC ACC ACA 946
Arg Gly Arg Ala Ala Pro Gly Leu Pro Leu Ser Ser Ala Pro Gly Thr Thr 28
AGG CCA CAT AAG GAG GGT GAG GTC CCT GGA GTG GAC TAC ATT TTC ATA ACC 997
Arg Pro His Lys Glu Gly Glu Val Pro Gly Val Asp Tyr Ile Phe Ile Thr 45
GTT GAG GAG TTT ATG GAA TTG GAG AAA AGT GGT CCT CTC CTA GAA AGC GGG 1048
Val Glu Glu Phe Met Glu Leu Glu Lys Ser Gly Ala Leu Leu Glu Ser Gly 62
ACC TAT GAA GAC AAC TAC TAC GGT ACC CCG AAG CCT CCA GCT GAA CCA GCA 1099
Thr Tyr Glu Asp Asn Tyr Tyr Gly Thr Pro lys Pro Pro Ala Glu Pro Ala 79
CCA TTA TTA AAT GTA ACA GAC CAG ATA CTT CCG GGA GCT ACT CCA AGT GCT 1150
Pro Leu Leu Asn Val Thr Asp Gln Ile Leu Pro Gly Ala Thr Pro Ser Ala 96
GAG GGG AAG CGG AAA AGA AAT AAG TCA GTG ACC AAC ATG GAG AAA GCA AGT 1201
Glu Gly Lys Arg Lys Arg Asn Lys Ser Val Thr Asn Met Glu Lys Ala Ser 113
ATA GAG CCT CCA GAG GAG GAA GAA GAA GAA AGG CCT GTA GTC AAT GGA AAC 1252
Ile Glu Pro Pro Glu Glu Glu Glu Glu Arg Pro Val Val Asn Gly Asn 130
GGC GTG GTC ATA ACC CCA GAA TCC AGT GAA CAT GAA GAC AAA AGT GCA GGT 1303
Gly Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Ser Glu His Glu Asp Lys Ser Ala Gly 147

3/24

☒ 3

GCC TCA GGG GAG ACA CCC TCC CAG CCT TAC CCT GCA CCC GTG TAC AGC CAG 1354
Ala Ser Gly Glu Thr Pro Ser Gln Pro Tyr Pro Ala Pro Val Tyr Ser Gln 164
CCC GAA GAG CTC AAG GAC CAG ATG GAC GAT ACA AAG CCA ACA AAG CCT GAG 1405
Pro Glu Glu Leu Lys Asp Gln Met Asp Asp Thr Lys Pro Thr Lys Pro Glu 181
GAG AAC GAG GAC TCT GAT CCA TTG CCT GAT AAC TGG GAA ATG GCC TAC ACA 1456
Glu Asn Glu Asp Ser Asp Pro Leu Pro Asp Asn Trp Glu Met Ala Tyr Thr 198
GAG AAG GGG GAA GTC TAC TTC ATT GAC CAT AAC ACA AAG ACA ACA TCA TGG 1507
Glu Lys Gly Glu Val Tyr Phe Ile Asp His Asn Thr Lys Thr Thr Ser Trp 215
CTG GAT CCG CGA CTT GCG AAA AAG GCT AAA CCT CCA GAA GAG TGC AAA GAA 1558
Leu Asp Pro Arg Leu Ala Lys Lys Ala Lys Pro Pro Glu Glu Cys Lys Glu 232
AAT GAG CTT CCA TAT GGC TGG GAA AAA ATC GAT GAT CCT ATA TAT GGC ACT 1609
Asn Glu Leu Pro Tyr Gly Trp Glu Lys Ile Asp Asp Pro Ile Tyr Gly Thr 249
TAC TAT GTT GAC CAC ATA AAT AGA AGA ACA CAG TTT GAA AAC CCT GTC CTG 1660
Tyr Tyr Val Asp His Ile Asn Arg Arg Thr Gln Phe Glu Asn Pro Val Leu 266
GAA GCA AAA AGG AAG CTA CAG CAA CAT AAC ATG CCC CAC ACA GAA CTT GGA 1711
Glu Ala Lys arg Lys Leu Gln Gln His Asn Met Pro His Thr Glu Leu Gly 283

4

GCA AAG CCC CTG CAG GCC CCA GGT TTC CGA GAA AAG CCA CTC TTC ACC CGG 1762
Ala Lys Pro Leu Gln Ala Pro Gly Phe Arg Glu Lys Pro Leu Phe Thr Arg 300
GAT GCA TCC CAG TTG AAG GGA ACG TTC CTC AGC ACC ACC CTC AAA AAG AGC 1813
Asp Ala Ser Gln Leu Lys Gly Thr Phe Leu Ser Thr Thr Leu Lys Lys Ser 317
AAC ATG GGC TTT GGG TTT ACC ATA ATT GGT GGA GAC GAG CCG GAT GAG TTT 1864
Asn Met Gly Phe Gly Phe Thr Ile Ile Gly Gly Asp Glu Pro Asp Glu Phe 334
CTA CAG GTG AAA AGT GTG ATC CCG GAT GGG CCT GCC GCA CAG GAT GGG AAA 1915
Leu Gln Val Lys Ser Val Ile Pro Asp Gly Pro Ala Ala Gln Asp Gly Lys 351
ATG GAG ACA GGT GAT GTC ATT GTC TAT ATT AAT GAA GTT TGT GTC CTT GGA 1966
Met Glu Thr Gly Asp Val Ile Val Tyr Ile Asn Glu Val Cys Val Leu Gly 368
CAC ACT CAT GCA GAT GTT GTC AAA CTT TTC CAG TCT GTT CCT ATT GGT CAG 2017
His Thr His Ala Asp Val Val Lys Leu Phe Gln Ser Val Pro Ile Gly Gln 385
AGT GTC AAC TTG GTG TTG TGT CGT GGC TAC CCT TTG CCC TTT GAC CCT GAA 2068
Ser Val Asn Leu Val Leu Cys Arg Gly Tyr Pro Leu Pro Phe Asp Pro Glu 402
GAT CCT GCT AAC AGC ATG GTG CCA CCC CTT GCA ATA ATG GAG AGG CCA CCT 2119
Asp Pro Ala Asn Ser Met Val Pro Pro Leu Ala Ile Met Glu Arg Pro Pro 419

5/24

☒ 57

CCG GTG ATG GTC AAT GGA AGA CAT AAC TAT GAA ACA TAC TTG GAA TAC ATT 2170
 Pro Val Met Val Asn Gly Arg His Asn Tyr Glu Thr Tyr Leu Glu Tyr Ile 436
 TCT CGG ACC TCA CAG TCG GTC CCA GAT ATT ACA GAC CGG CCA CCT CAT TCT 2221
 Ser Arg Thr Ser Gln Ser Val Pro Asp Ile Thr Asp Arg Pro Pro His Ser 453
 TTG CAC TCC ATG CCA GCT GAC GGC CAG CTA GAT GGC ACG TAT CCA CCA CCC 2272
 Leu his Ser Met Pro Ala Asp Gly Gln Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro Pro 470
 GTC CAT GAC GAC AAT GTG TCT ATG GCT TCG TCT GGA GCC ACT CAA GCT GAA 2323
 Val His Asp Asp Asn Val Ser Met Ala Ser Ser Gly Ala Thr Gln Ala Glu 487
 CTT ATG ACC TTA ACC ATT GTG AAA GGT GCC CAG GGA TTT GGC TTT ACT ATT 2374
 Leu Met Thr Leu Thr Ile Val Lys Gly Ala Gln Gly Phe Gly Phe Thr Ile 504
 GCC GAC AGT CCC ACG GGA CAG CGG GTG AAA CAA ATC CTT GAC ATT CAG GGA 2425
 Ala Asp Ser Pro Thr Gly Gln Arg Val Lys Gln Ile Leu Asp Ile Gln Gly 521
 TGC CCT GGG CTG TGT GAA GGA GAC CTC ATT GTT GAG ATC AAC CAA CAG AAT 2476
 Cys Pro Gly Leu Cys Glu Gly Asp Leu Ile Val Glu Ile Asn Gln Gln Asn 538
 GTA CAG AAC CTG AGC CAT ACA GAA GTA GTG GAT ATA CTT AAG GAC TGC CCC 2527
 Val Gln Asn Leu Ser His Thr Glu Val Val Asp Ile Leu Lys Asp Cys Pro 555

6/24



GTT GGA AGT GAG ACT TCT TTA ATC ATC CAT CGA GGA GGT TTC TTT TCT CCA 2578
 Val Gly Ser Glu Thr Ser Leu Ile Ile His Arg Gly Gly Phe Ser Pro 572
 TGG AAA ACT CCA AAG CCT ATG ATG GAC CGA TGG GAG AAC CAA GGC AGT CCA 2629
 Trp Lys Thr Pro Lys Pro Met Met Asp Arg Trp Glu Asn Gln Gly Ser Pro 589
 CAA ACA AGT TTA TCT GCT CCG GCC GTC CCA CAG AAC CTG CCC TTC CCA CCT 2680
 Gln Thr Ser Leu Ser Ala Pro Ala Val Pro Gln Asn Leu Pro Phe Pro Pro 606
 GCC CTT CAC AGG AGC TCC TTT CCT GAT TCA ACA GAG GCC TTT GAC CCA CGG 2731
 Ala Leu His Arg Ser Ser Phe Pro Asp Ser Thr Glu Ala Phe Asp Pro Arg 623
 AAG CCT GAC CCA TAT GAG CTC TAC GAG AAA TCG AGA GCC ATT TAT GAA AGT 2782
 Lys Pro Asp Pro Tyr Glu Leu Tyr Glu Lys Ser Arg Ala Ile Tyr Glu Ser 640
 AGG CAA CAA GTG CCA CCC AGG ACC AGT TTT CGA ATG GAT TCC TCT GGT CCA 2833
 Arg Gln Gln Val Pro Pro Arg Thr Ser Phe Arg Met Asp Ser Ser Gly Pro 657
 GAT TAT AAG GAA CTG GAT GTT CAC CTT CGG AGG ATG GAG TCT GGA TTT GGC 2884
 Asp Tyr Lys Glu Leu Asp Val His Leu Arg Arg Met Glu Ser Gly Phe Gly 674
 TTT AGA ATC CTT GGG GGA GAT GAA CCT GGA CAG CCT ATT TTG ATC GGA GCC 2935
 Phe Arg Ile Leu Gly Gly Asp Glu Pro Gly Gln Pro Ile Leu Ile Gly Ala 691



GTC ATT GCC ATG GGC TCA GCT GAC AGA GAC GGC CGT CTA CAC CCA GGA GAT 2986
Val Ile Ala Met Gly Ser Ala Asp Arg Asp Gly Arg Leu His Pro Gly Asp 708
GAG CTT GTC TAT GTC GAT GGG ATC CCA GTG GCT GGC AAG ACC CAC CGC TAT 3037
Glu Leu Val Tyr Val Asp Gly Ile Pro Val Ala Gly Lys Thr His Arg Tyr 725
GTC ATC GAC CTC ATG CAC CAC GCG GCC CGC AAT GGG CAG GTT AAC CTC ACT 3088
Val Ile Asp Leu Met His His Ala Ala Arg Asn Gly Gln Val Asn Leu Thr 742
GTG AGA AGA AAG GTG CTA TGT GGA GGG GAG CCC TGC CCA GAG AAT GGG AGG 3139
Val Arg Arg Lys Val Leu Cys Gly Gly Glu Pro Cys Pro Glu Asn Gly Arg 759
AGT CCA GGC TCT GTA TCA ACT CAC CAC AGC TCT CCG CGC AGT GAC TAT GCC 3190
Ser Pro Gly Ser Val Ser Thr His His Ser Ser Pro Arg Ser Asp Tyr Ala 776
ACC TAC TCC AAC AGC AAC CAC GCC GCC CCC AGC AGC AAT GCC TCA CCT CCT 3241
Thr Tyr Ser Asn Ser Asn His Ala Ala Pro Ser Ser Asn Ala Ser Pro Pro 793
GAA GGC TTT GCC TCA CAC AGC TTG CAG ACC AGT GAT GTG GTC ATT CAC CGC 3292
Glu Gly Phe Ala Ser His Ser Leu Gln Thr Ser Asp Val Val Ile His Arg 810
AAA GAA AAC GAA GGG TTT GGC TTC GTC ATC ATC AGC TCT CTG AAC AGG CCT 3343
Lys Glu Asn Glu Gly Phe Gly Phe Val Ile Ser Ser Leu Asn Arg Pro 827

•

•

•

•



GAG TCT GGA GCC ACC ATA ACT GTG CCC CAT AAA ATT GGA CGA ATC ATT GAT 3394
 Glu Ser Gly Ala Thr Ile Thr Val Pro His Lys Ile Gly Arg Ile Ile Asp 844
 GGG AGC CCT GCA GAT CGC TGT GCC AAA CTC AAA GTG GGC GAC CGT ATC TTA 3445
 Gly Ser Pro Ala Asp Arg Cys Ala Lys Leu Lys Val Gly Asp Arg Ile Leu 861
 GCA GTC AAC GGC CAG TCT ATC ATC AAC ATG CCT CAC GCT GAC ATT GTG AAG 3496
 Ala Val Asn Gly Gln Ser Ile Ile Asn Met Pro His Ala Asp Ile Val Lys 878
 CTC ATC AAG GAC GCC GGT CTC AGT GTC ACC CTT CGC ATC ATT CCT CAG GAG 3547
 Leu Ile Lys Asp Ala Gly Leu Ser Val Thr Leu Arg Ile Ile Pro Gln Glu 895
 GAG CTC AAC AGC CCA ACA TCA GCA CCC AGT TCA GAG AAA CAG AGC CCC ATG 3598
 Glu Leu Asn Ser Pro Thr Ser Ala Pro Ser Ser Glu Lys Gln Ser Pro Met 912
 GCC CAG CAG CAC AGC CCT CTG GCC CAG CAG AGT CCT CTG GCC CAG CCA AGC 3649
 Ala Gln Gln His Ser Pro Leu Ala Gln Gln Ser Pro Leu Ala Gln Pro Ser 929
 CCC GCC ACC CCC AAC AGC CCA GTC GCA CAG CCA GCT CCT CCC CAA CCT CTC 3700
 Pro Ala Thr Pro Asn Ser Pro Val Ala Gln Pro Ala Pro Pro Gln Pro Leu 946
 CAG CTG CAA GGA CAC GAA AAT AGT TAC AGG TCA GAA GTT AAA GCG AGG CAA 3751
 Gln Leu Gln Gly His Glu Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Val Lys Ala Arg Gln 963

9/24

☒ 9

GAT GTG AAG CCA GAC ATC CGG CAG CCT CCC TTC ACA GAC TAC AGG CAG CCC 3802
Asp Val Lys Pro Asp Ile Arg Gln Pro Pro Phe Thr Asp Tyr Arg Gln Pro 980
CCG CTG GAC TAC AGG CAG CCC CCG GGA GAC TAC TCA CAG CCC CCA CCC 3853
Pro Leu Asp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Gly Asp Tyr Ser Gln Pro Pro Pro 997
TTG GAC TAC AGG CAG CAC TCT CCA GAC ACC AGG CAG TAC CCT CTG TCA GAC 3904
Leu Asp Tyr Arg Gln His Ser Pro Asp Tyr Arg Gln Tyr Pro Leu Ser Asp 1014
TAC AGG CAG CCA CAG GAT TTT GAT TAT TTC ACT GTG GAC ATG GAG AAA GGA 3955
Tyr Arg Gln Pro Gln Asp Phe Asp Tyr Phe Thr Val Asp Met Glu Lys Gly 1031
GCC AAA GGA TTT GGA TTC AGC ATT CGT GGA GGA AGG GAA TAC AAG ATG GAT 4006
Ala Lys Gly Phe Gly Phe Ser Ile Arg Gly Gly Arg Glu Tyr Lys Met Asp 1048
CTG TAT GTG TTG AGA TTG GCA GAG GAT GGG CCA GCC ATA AGG AAC GGC AGG 4057
Leu Tyr Val Leu Arg Leu Ala Glu Asp Gly Pro Ala Ile Arg Asn Gly Arg 1065
ATG AGG GTA GGA GAT CAG ATC ATT GAA ATA AAT GGG GAA AGC ACA CGA GAC 4108
Met Arg Val Gly Asp Gln Ile Ile Glu Ile Asn Gly Glu Ser Thr Arg Asp 1082
ATG ACC CAC GCC AGA GCA ATA GAA CTC ATC AAG TCT GGA GGA AGA AGA GTG 4159
Met Thr His Ala Arg Ala Ile Glu Leu Ile Lys Ser Gly Gly Arg Arg Val 1099

10/24

☒ 1 O

CGG CTG CTG AAG AGA GGC ACG GGG CAG GTC CCG GAG TAT GGA ATG GTA 4210
Arg Leu Leu Lys Arg Gly Thr Gly Gln Val Pro Glu Tyr Gly Met Val 1116
CCT TCC AGC CTC TCC ATG TGC ATG AAA AGT GAC AAG CAT GGG TCC CCA TAT 4261
Pro Ser Ser Leu Ser Met Cys Met Lys Ser Asp Lys His Gly Ser Pro Tyr 1133
TTC TAC TTA CTG GGC CAC CCT AAA GAC ACG ACG AAC CCC ACG CCT GGA GTG 4312
Phe Tyr Leu Leu Gly His Pro Lys Asp Thr Thr Asn Pro Thr Pro Gly Val 1150
CTG CCG CTG CCG CCC CAG GCC TGC CGG AAG TAGGCGTCTCCCTCGAAGACATC 4368
Leu Pro Leu Pro Pro Pro Gln Ala Cys Arg Lys 1161
CTCTCTCCATTCTCTCCATCACATCCAGCCCCACCCTCCGACCCTTCCCACCATAGGC 4428
CCAGACCCAACTTGGGATATCCAAAGGGAACACGACGTTAGGAAACCAAGAGCTTTCG 4488
GCCGGGGCCAGAGAAGCAGCGCCTGGGGAGCAGAGGAGCGCTCGGCGAGCCCCGCGAG 4548
CGCAGTGC GGCGCCAGGCTGGAGGAGGTGCCGGGGCCAGGGGGCGCCGAGGCCGCGC 4608
AGGCCCGCCTCGGAGCGCGCCGACGGGAAGGAGGCGCTGCGCGGGCGCGGTGAGGGCCTC 4668
GGGGCGGGCGGGAGGGCCGAGGCCAAGTGCGGTGTCCGCTCGGGGGCGCCGACCC 4728
GCAGCGGGGCCCCACGGGGGGCGGCCAGCGGCCAAGCGCACGATGGCGCGGGGCCCTGG 4788
AAGGTGCGGGGCTCCGACAAGCTGCCGGGGCGGCCCTGCAGCCTGGCGGCCTCGGCGCGGGC 4848

☒ 1 1

4908 AGATGAGCCCCAAGGCGAGGGCCCCCGCCCGCCTCCACGCAGGCCGATCTTCTGGGTT
4968 CCGTCTCACGGCGTTTAAATTTATTTCCACTGTCAACGCATAGATCTATACGAGGCGCC
5028 GAAGCCCGGAGCGCGCGTGCAGCGCGGTAGCGGCACGGCACGGTGTGCGCGCAGG
5088 CAGACCTAACTGATCCTAAAGCCCCCGTTCCATGGTGGGAGCTTTGGCAGCTACGGAA
5148 GAACCAAAATCACGCAACATCACAGAGAGACAGTGCAGTGTAGCTTTAGATTCAAAAAA
5156 AAAAAAA

TCGCCGCCACGACGGCCAGCACCTCCGAGCGACTGACCGACCTCCACGGCGGTCCCGA	60	<input checked="" type="checkbox"/>	1	2
ACACACTGCCACCGCGCGCGCGCGGCTCGCGCGGCACTCCCTCGCACGTCACC	120			
ACGTGGGCTGCCGCCAACGCCCTCCCGCGCGCTTCCGGCTCTGATGCCTGAGCGAATCACA	180			
GGCGAGCTCCCGGGAAGATCCCGCTCTGAGGCTCCGCCCCGGACAGGGCCCCCGCCAC	240			
TCATAGCTCTTTCTCAGCGCCCCCTCCTTCCTTCTCGGCTCAACTAGTCAGCGCAA	300			
GGTGATCCCGGAGAGCGGGGGGGGACCGCTCCTCCTGTTACTTATCGAGCGGCGGC	360			
TCCCTCCCGAGCCTCACACCCTCGCTTCGCCCCTTTTTTCCACTGTCCAGGAACTGGTT	420			
CCCTCCTTCTCTCCACCTGCCCTACCTTCTCCAGAGATCCGACGTGGCGATTAGAGTT	480			
CTCAGCGTCACACTGACTTCTAGGCAACTAGCCTAGACTGGAGCTGCGTGTGTGGGAAC	540			
CCCGCGCAGTAGTTGAGCATCAGGCTCTTACCTTGGAGGTGGAGGGGTGAGAAGAATAG	600			
AGGAAGAAGGATAAGTCAGAGGAGGGCCTGAACAACCTAGCCCCCTCTATTGGCCTGCTTT	660			
GGGTGAGCATTTCAGTGAGTGTGTTAAAAAAGGAGGGGAAACAAAGACCTCAG	720			
GAGCAGTTTGTGTGTGTGTGGCTTCAAGAAGAAAAATCTAGACATTTATGCCCGC	780			
AAGACCAAGCTCAGCTAAGACTACTTCTCCCAAGAAGATAATTGTATCAGAGCATGGGT	840			
TGGATCAGTACAGGTGGTTTGAGGAGACGCTGACAGAGGACCATCGAAAGTGGGAGAGG	900			
ACGCGGGGCTCCTGGGCTTCTCTGAGCTCAGCTCCAGGCCACCACAAAGGCCACATAAGGA	960			

GGGTGAGTCCCTGGAGTGGACTACTACATTTTCATAACCGTTGAGGAGTTT ATG GAA TTG GAG 1021
Met Glu Leu Glu 4
AAA AGT GGT GCT CTC CTA GAA AGC GGG ACC TAT GAA GAC AAC TAC TAC GGT 1072
Lys Ser Gly Ala Leu Leu Glu Ser Gly Thr Tyr Glu Asp Asn Tyr Tyr Gly 21
ACC CCG AAG CCT CCA GCT GAA CCA CCA CCA TTA TTA AAT GTA ACA GAC CAG 1123
Thr Pro Lys Pro Pro Ala Glu Pro Ala Pro Leu Leu Asn Val Thr Asp Gln 38
ATA CTT CCG GGA GCT ACT CCA AGT GCT GAG GGG AAG CGG AAA AGA AAT AAG 1174
Ile Leu Pro Gly Ala Thr Pro Ser Ala Glu Gly Lys Arg Lys Arg Asn Lys 55
TCA GTG ACC AAC ATG GAG AAA GCA AGT ATA GAG CCT CCA GAG GAG GAA GAA 1225
Ser Val Thr Asn Met Glu Lys Ala Ser Ile Glu Pro Pro Glu Glu Glu Glu 72
GAA GAA AGG CCT GTA GTC AAT GGA AAC GGC GTG GTC ATA ACC CCA GAA TCC 1276
Glu Glu Arg Pro Val Val Asn Gly Asn Gly Val Val Ile Thr Pro Glu Ser 89
AGT GAA CAT GAA GAC AAA AGT GCA GGT GCC TCA GGG GAG ACA CCC TCC CAG 1327
Ser Glu His Glu Asp Lys Ser Ala Gly Ala Ser Gly Glu Thr Pro Ser Gln 106
CCT TAC CCT GCA CCC GTG TAC AGC CAG CCC GAA GAG CTC AAG GAC CAG ATG 1378
Pro Tyr Pro Ala Pro Val Tyr Ser Gln Pro Glu Glu Leu Lys Asp Gln Met 123

☒ 1 62

☒ 1 4

GAC GAT ACA AAG CCA ACA AAG CCT GAG GAG AAC GAG GAC TCT GAT CCA TTG 1429
 Asp Asp Thr Lys Pro Thr Lys Pro Glu Glu Asn Glu Asp Ser Asp Pro Leu 140
 CCT GAT AAC TGG GAA ATG GCC TAC ACA GAG AAG GGG GAA GTC TAC TTC ATT 1480
 Pro Asp Asn Trp Glu Met Ala Tyr Thr Glu Lys Gly Glu Val Tyr Phe Ile 157
 GAC CAT AAC ACA AAG ACA ACA TCA TGG CTG GAT CCG CGA CTT GCG AAA AAG 1531
 Asp His Asn Thr Lys Thr Thr Ser Trp Leu Asp Pro Arg Leu Ala Lys Lys 174
 GCT AAA CCT CCA GAA GAG TGC AAA GAA AAT GAG CTT CCA TAT GGC TGG GAA 1582
 Ala Lys Pro Pro Glu Glu Cys Lys Glu Asn Glu Leu Pro Tyr Gly Trp Glu 191
 AAA ATC GAT GAT CCT ATA TAT GGC ACT TAC TAT GTT GAC CAC ATA AAT AGA 1633
 Lys Ile Asp Asp Pro Ile Tyr Gly Thr Tyr Tyr Val Asp His Ile Asn Arg 208
 AGA ACA CAG TTT GAA AAC CCT GTC CTG GAA GCA AAA AGG AAG CTA CAG CAA 1684
 Arg Thr Gln Phe Glu Asn Pro Val Leu Glu Ala Lys arg Lys Leu Gln Gln 225
 CAT AAC ATG CCC CAC ACA GAA CTT GGA GCA AAG CCC CTG CAG GCC CCA GGT 1735
 His Asn Met Pro His Thr Glu Leu Gly Ala Lys Pro Leu Gln Ala Pro Gly 242
 TTC CGA GAA AAG CCA CTC TTC ACC CGG GAT GCA TCC CAG TTG AAG GGA ACG 1786
 Phe Arg Glu Lys Pro Leu Phe Thr Arg Asp Ala Ser Gln Leu Lys Gly Thr 259

TTC CTC AGC ACC ACC CTC AAA AAG AGC AAC ATG GGC TTT GGG TTT ACC ATA 1837
Phe Leu Ser Thr Thr Leu Lys Lys Ser Asn Met Gly Phe Gly Phe Thr Ile 276
ATT GGT GGA GAC GAG CCG GAT GAG TTT CTA CAG GTG AAA AGT GTG ATC CCG 1888
Ile Gly Gly Asp Glu Pro Asp Glu Phe Leu Gln Val Lys Ser Val Ile Pro 293
GAT GGG CCT GCC GCA CAG GAT GGG AAA ATG GAG ACA GGT GAT GTC ATT GTC 1939
Asp Gly Pro Ala Ala Gln Asp Gly Lys Met Glu Thr Gly Asp Val Ile Val 310
TAT ATT AAT GAA GTT TGT GTC CTT GGA CAC ACT CAT GCA GAT GTT GTC AAA 1990
Tyr Ile Asn Glu Val Cys Val Leu Gly His Thr His Ala Asp Val Val Lys 327
CTT TTC CAG TCT GTT CCT ATT GGT CAG AGT GTC AAC TTG GTG TTG TGT CGT 2041
Leu Phe Gln Ser Val Pro Ile Gly Gln Ser Val Asn Leu Val Leu Cys Arg 344
GGC TAC CCT TTG CCC TTT GAC CCT GAA GAT CCT GCT AAC AGC ATG GTG CCA 2092
Gly Tyr Pro Leu Pro Phe Asp Pro Glu Asp Pro Ala Asn Ser Met Val Pro 361
CCC CTT GCA ATA ATG GAG AGG CCA CCT CCG GTG ATG GTC AAT GGA AGA CAT 2143
Pro Leu Ala Ile Met Glu Arg Pro Pro Val Met Val Asn Gly Arg His 378
AAC TAT GAA ACA TAC TTG GAA TAC ATT TCT CGG ACC TCA CAG TCG GTC CCA 2194
Asn Tyr Glu Thr Tyr Leu Glu Tyr Ile Ser Arg Thr Ser Gln Ser Val Pro 395

☒ 1 51

☒ 1 6

GAT ATT ACA GAC CGG CCA CCT CAT TCT TTG CAC TCC ATG CCA GCT GAC GGC 2245
Asp Ile Thr Asp Arg Pro Pro His Ser Leu his Ser Met Pro Ala Asp Gly 412
CAG CTA GAT GGC ACG TAT CCA CCA CCC GTC CAT GAC GAC AAT GTG TCT ATG 2296
Gln Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro Pro Val His Asp Asp Asn Val Ser Met 429
GCT TCG TCT GGA GCC ACT CAA GCT GAA CTT ATG ACC TTA ACC ATT GTG AAA 2347
Ala Ser Ser Gly Ala Thr Gln Ala Glu Leu Met Thr Leu Thr Ile Val Lys 446
GGT GCC CAG GGA TTT GGC TTT ACT ATT GCC GAC AGT CCC ACG GGA CAG CGG 2398
Gly Ala Gln Gly Phe Gly Phe Thr Ile Ala Asp Ser Pro Thr Gly Gln Arg 463
GTG AAA CAA ATC CTT GAC ATT CAG GGA TGC CCT GGG CTG TGT GAA GGA GAC 2449
Val Lys Gln Ile Leu Asp Ile Gln Gly Cys Pro Gly Leu Cys Glu Gly Asp 480
CTC ATT GTT GAG ATC AAC CAA CAG AAT GTA CAG AAC CTG AGC CAT ACA GAA 2500
Leu Ile Val Glu Ile Asn Gln Gln Asn Val Gln Asn Leu Ser His Thr Glu 497
GTA GTG GAT ATA CTT AAG GAC TGC CCC GTT GGA AGT GAG ACT TCT TTA ATC 2551
Val Val Asp Ile Leu Lys Asp Cys Pro Val Gly Ser Glu Thr Ser Leu Ile 514
ATC CAT CGA GGA GGT TTC TTT TCT CCA TGG AAA ACT CCA AAG CCT ATG ATG 2602
Ile His Arg Gly Gly Phe Phe Ser Pro Trp Lys Thr Pro Lys Pro Met Met 531

GAC CGA TGG GAG AAC CAA GGC AGT CCA CAA ACA AGT TTA TCT GCT CCG GCC 2653
 Asp Arg Trp Glu Asn Gln Gly Ser Pro Gln Thr Ser Leu Ser Ala Pro Ala 548
 GTC CCA CAG AAC CTG CCC TTC CCA CCT GCC CTT CAC AGG AGC TCC TTT CCT 2704
 Val Pro Gln Asn Leu Pro Phe Pro Pro Ala Leu His Arg Ser Ser Phe Pro 565
 GAT TCA ACA GAG GCC TTT GAC CCA CGG AAG CCT GAC CCA TAT GAG CTC TAC 2755
 Asp Ser Thr Glu Ala Phe Asp Pro Arg Lys Pro Asp Pro Tyr Glu Leu Tyr 582
 GAG AAA TCG AGA GCC ATT TAT GAA AGT AGG CAA CAA GTG CCA CCC AGG ACC 2806
 Glu Lys Ser Arg Ala Ile Tyr Glu Ser Arg Gln Gln Val Pro Pro Arg Thr 599
 AGT TTT CGA ATG GAT TCC TCT GGT CCA GAT TAT AAG GAA CTG GAT GTT CAC 2857
 Ser Phe Arg Met Asp Ser Ser Gly Pro Asp Tyr Lys Glu Leu Asp Val His 616
 CTT CGG AGG ATG GAG TCT GGA TTT GGC TTT AGA ATC CTT GGG GGA GAT GAA 2908
 Leu Arg Arg Met Glu Ser Gly Phe Gly Phe Arg Ile Leu Gly Gly Asp Glu 633
 CCT GGA CAG CCT ATT TTG ATC GGA GCC GTC ATT GCC ATG GGC TCA GCT GAC 2959
 Pro Gly Gln Pro Ile Leu Ile Gly Ala Val Ile Ala Met Gly Ser Ala Asp 650
 AGA GAC GGC CGT CTA CAC CCA GGA GAT GAG CTT GTC TAT GTC GAT GGG ATC 3010
 Arg Asp Gly Arg Leu His Pro Gly Asp Glu Leu Val Tyr Val Asp Gly Ile 667

☒
☐
☐

☒ 1 00

CCA GTG GCT GGC AAG ACC CAC CGC TAT GTC ATC GAC CTC ATG CAC CAC GCG 3061
 Pro Val Ala Gly Lys Thr His Arg Tyr Val Ile Asp Leu Met His His Ala 684
 GCC CGC AAT GGG CAG GTT AAC CTC ACT GTG AGA AGA AAG GTG CTA TGT GGA 3112
 Ala Arg Asn Gly Gln Val Val Asn Leu Thr Val Arg Arg Lys Val Leu Cys Gly 701
 GGG GAG CCC TGC CCA GAG AAT GGG AGG AGT CCA GGC TCT GTA TCA ACT CAC 3163
 Gly Glu Pro Cys Pro Glu Asn Gly Arg Ser Pro Gly Ser Val Ser Thr His 718
 CAC AGC TCT CCG CGC AGT GAC TAT GCC ACC TAC TCC AAC AGC AAC CAC GCC 3214
 His Ser Ser Pro Arg Ser Asp Tyr Ala Thr Tyr Ser Asn Ser Asn His Ala 735
 GCC CCC AGC AGC AAT GCC TCA CCT CCT GAA GGC TTT GCC TCA CAC AGC TTG 3265
 Ala Pro Ser Ser Asn Ala Ser Pro Pro Glu Gly Phe Ala Ser His Ser Leu 752
 CAG ACC AGT GAT GTG GTC ATT CAC CGC AAA GAA AAC GAA GGG TTT GGC TTC 3316
 Gln Thr Ser Asp Val Val Ile His Arg Lys Glu Asn Glu Gly Phe Gly Phe 769
 GTC ATC ATC AGC TCT CTG AAC AGG CCT GAG TCT GGA GCC ACC ATA ACT GTG 3367
 Val Ile Ile Ser Ser Leu Asn Arg Pro Glu Ser Gly Ala Thr Ile Thr Val 786
 CCC CAT AAA ATT GGA CGA ATC ATT GAT GGG AGC CCT GCA GAT CGC TGT GCC 3418
 Pro His Lys Ile Gly Arg Ile Ile Asp Gly Ser Pro Ala Asp Arg Cys Ala 803

☒ 1 9

AAA CTC AAA GTG GGC GAC CGT ATC TTA GCA GTC AAC GGC CAG TCT ATC ATC 3469
 Lys Leu Lys Val Gly Asp Arg Ile Leu Ala Val Asn Gly Gln Ser Ile Ile 820
 AAC ATG CCT CAC GCT GAC ATT GTG AAG CTC ATC AAG GAC GCC GGT CTC AGT 3520
 Asn Met Pro His Ala Asp Ile Val Lys Leu Ile Lys Asp Ala Gly Leu Ser 837
 GTC ACC CTT CGC ATC ATT CCT CAG GAG GAG CTC AAC AGC CCA ACA TCA GCA 3571
 Val Thr Leu Arg Ile Ile Pro Gln Glu Glu Leu Asn Ser Pro Thr Ser Ala 854
 CCC AGT TCA GAG AAA CAG AGC CCC ATG GCC CAG CAG CAC AGC CCT CTG GCC 3622
 Pro Ser Ser Glu Lys Gln Ser Pro Met Ala Gln Gln His Ser Pro Leu Ala 871
 CAG CAG AGT CCT CTG GCC CAG CCA AGC CCC GCC ACC CCC AAC AGC CCA GTC 3673
 Gln Gln Ser Pro Leu Ala Gln Pro Ser Pro Ala Thr Pro Asn Ser Pro Val 888
 GCA CAG CCA GCT CCT CCC CAA CCT CTC CAG CTG CAA GGA CAC GAA AAT AGT 3724
 Ala Gln Pro Ala Pro Pro Gln Pro Leu Gln Leu Gln Gly His Glu Asn Ser 905
 TAC AGG TCA GAA GTT AAA GCG AGG CAA GAT GTG AAG CCA GAC ATC CGG CAG 3775
 Tyr Arg Ser Glu Val Lys Ala Arg Gln Asp Val Lys Pro Asp Ile Arg Gln 922
 CCT CCC TTC ACA GAC TAC AGG CAG CCC CCG CTG GAC TAC AGG CAG CCC CCG 3826
 Pro Pro Phe Thr Asp Tyr Arg Gln Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln Pro Pro 939

☒ N O

GGA GGA GAC TAC TCA CAG CCC CCA CCC TTG GAC TAC AGG CAG CAC TCT CCA 3877
 Gly Gly Asp Tyr Ser Gln Pro Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln His Ser Pro 956
 GAC ACC AGG CAG TAC CCT CTG TCA GAC TAC AGG CAG CCA CAG GAT TTT GAT 3928
 Asp Tyr Arg Gln Tyr Pro Leu Ser Asp Tyr Arg Gln Pro Gln Asp Phe Asp 973
 TAT TTC ACT GTG GAC ATG GAG AAA GGA GCC AAA GGA TTT GCA TTC AGC ATT 3979
 Tyr Phe Thr Val Asp Met Glu Lys Gly Ala Lys Gly Phe Gly Phe Ser Ile 990
 CGT GGA GGA AGG GAA TAC AAG ATG GAT CTG TAT CTG TTG AGA TTG GCA GAG 4030
 Arg Gly Gly Arg Glu Tyr Lys Met Asp Leu Tyr Val Leu Arg Leu Ala Glu 1007
 GAT GGG CCA GCC ATA AGG AAC GGC AGG ATG AGG GTA GGA GAT CAG ATC ATT 4081
 Asp Gly Pro Ala Ile Arg Asn Gly Arg Met Arg Val Gly Asp Gln Ile Ile 1024
 GAA ATA AAT GGG GAA AGC ACA CGA GAC ATG ACC CAC GCC AGA GCA ATA GAA 4132
 Glu Ile Asn Gly Glu Ser Thr Arg Asp Met Thr His Ala Arg Ala Ile Glu 1041
 CTC ATC AAG TCT GGA GGA AGA AGA GTG CGG CTG CTG AAG AGA GGC ACG 4183
 Leu Ile Lys Ser Gly Gly Arg Arg Val Arg Leu Leu Lys Arg Gly Thr 1058
 GGG CAG GTC CCG GAG TAT GGA ATG GTA CCT TCC AGC CTC TCC ATG TGC ATG 4234
 Gly Gln Val Pro Glu Tyr Gly Met Val Pro Ser Ser Leu Ser Met Cys Met 1075

AAA AGT GAC AAG CAT GGG TCC CCA TAT TTC TAC TTA CTG GGC CAC CCT AAA 4285
 Lys Ser Asp Lys His Gly Ser Pro Tyr Phe Tyr Leu Leu Gly His Pro Lys 1092
 GAC ACG ACG AAC CCC ACG CCT GGA GTG CTG CCG CTG CCG CCC CAG GCC 4336
 Asp Thr Thr Asn Pro Thr Pro Gly Val Leu Pro Leu Pro Pro Gln Ala 1109
 TGC CGG AAG TAGGCGTCTCCCTCGAAGACATCCTCTCTCCATTCTCTCCATCACATCCAGCCCC 4400
 Cys Arg Lys 1112
 ACCCTCCGACCCCTTCCACCCAGATAGGCCCCAGACCCAACTTGGGATATCCAAAGGGAACA 4460
 CGACGTTAGGAAACCAAGGAGCTTTCGGCCGGCGGCCAGAGAAGCAGCCCTGGGGGA 4520
 GCAGAGGAGCGCTCGGCGAGCCCGCAGCGCAGTCCGCGGCCCCAGGCTGGAGGAGGTGCC 4580
 CGGCGGCCAGGGGCGGCCCGAGGCCGGCAGGCCCGCCCTCGGAGGCGGCCGACGGGAAGGA 4640
 GCGGCTGCGCGCGCGCGTGAGGGCCCTCGGGCGCGCGGGCGCGGAGGCCGAGGCCAA 4700
 GGTGGGTGTGCGCTCGGGGGCCCGACCCGACGCGCGGCCCCACGGGGGGCGGCCAGCGCG 4760
 CAAGCGGACGATGGCGCGCGGGGCCCTGGAAGGTGCCGGGCTCCGACAAGCTGCCGGGGCG 4820
 CCTGCAGCCCTGGCGCCCTCGGCGCGGGGCGAGATGAGCCCCAAGGCGAGGGCCCCCGCCCCG 4880
 CCTCCACGACGGCCGATCTTCCTGGGTTCCGTTCCGTTCCAGGGGTTTTAATTTATTTCCACTG 4940
 TCACACGCATAGATCTATACGAGGCGGCCGAAGCCCCGGGAGCGCCGGCGTCCGACGGCGGT 5000

☒ 2 1

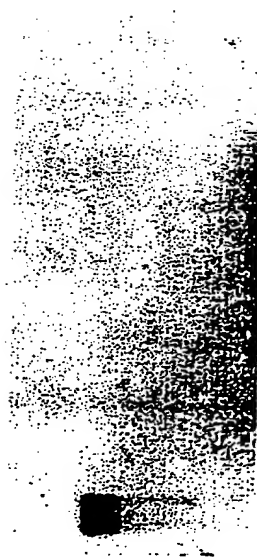
☒ 2 2

AGGCGGCACGGCACGGTGTGCGGCGCAGGCAGACCTAAACTGATCCTAAAGCCCCCGGTTT	5060
CATGGTGGGAGCTTTGGCAGCTACGGAAGAACCACCAAAATCAGGCAAAACATCACAGAGAGAC	5120
AGTGCAGTGTAGCTTTAGATTCAAAAAAAAAAAAAA	5156

☒ 2 3

G3PDH:グリセルアルデヒド 3-りん酸
脱水素酵素

10kb —
6kb —
4kb —



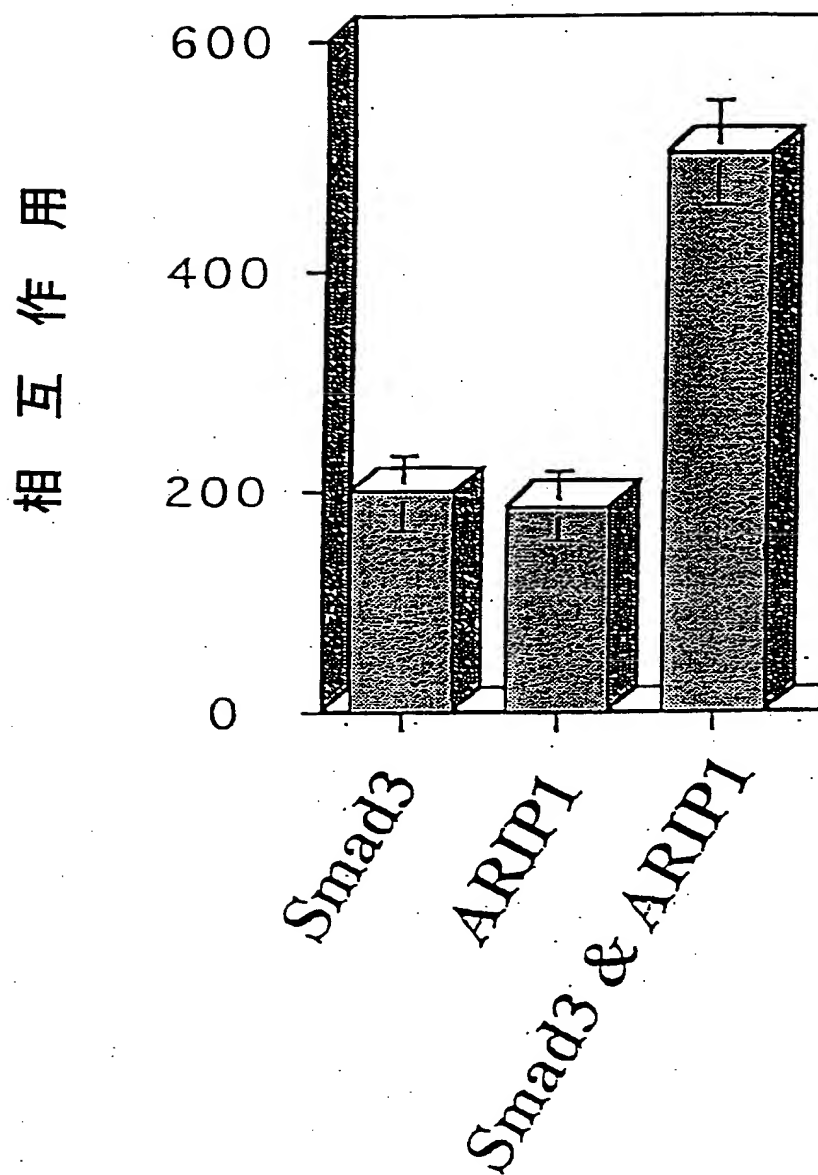
G3PDH



脳 肝 脾 肺 腎 心 精 巢 卵 巢 骨 格 筋

24/24

図 24



SEQUENCE LISTING

<110>Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120>Novel Protein And Its Use

<130>2569W00P

5 <150>JP 10-323199

<151>1998-11-13

<150>JP 10-346925

<151>1998-12-07

<160>8

10 <210>1

<211>1466

<212>DNA

<213>Mouse

<400>1

15 AGACATCACA AGATGGCCTA CCCTCCTGTA CTTGTTCTTA CTCAACACGC CTTTCATATA 60
ATGATAGAGG ACCCAGGACC ACCCCCACCT TCCCATTAC TAGGGTTGAA GCCATTGCAG 120
CTGTTAGAAG TGAAAGCAAG GGGAAGATTT GGTGTGTCT GGAAAGCCCA GTTGCTCAAT 180
GAATATGTGG CTGTCAAAAT ATTTCCAATA CAGGACAAAC AGTCCTGGCA GAATGAATAT 240
GAAGTCTATA GTCTACCTGG AATGAAGCAT GAGAACATAC TACAGTTCAT TGGTGCAGAG 300
20 AAAAGAGGCA CCAGTGTGGA TGTGGACCTG TGGCTAATCA CAGCATTTC TGAAGAGGGC 360
TCACTGTCAG ACTTTCTTAA GGCTAATGTG GTCTCTTGGA ATGAACCTTG TCATATTGCA 420
GAAACCATGG CTAGAGGATT GGCATATTTA CATGAGGATA TACCTGGCTT AAAAGATGGC 480
CACAAGCCTG CAATCTCTCA CAGGGACATC AAAAGTAAAA ATGTGCTGTT GAAAAACAAT 540
CTGACAGCTT GCATTGCTGA CTTTGGGTTG GCCTTAAAGT TCGAGGCTGG CAAGTCTGCA 600
25 GGTGACACCC ATGGGCAGGT TGGTACCCGG AGGTATATGG CTCCAGAGGT GTTGGAGGGT 660
GCTATAAACT TCCAAAGGGA CGCATTTCTG AGGATAGATA TGTACGCCAT GGGATTAGTC 720
CTATGGGAAT TGGCTTCTCG TTGCACTGCT GCAGATGGAC CCGTAGATGA GTACATGTTA 780
CCATTTGAGG AAGAAATTGG CCAGCATCCA TCTCTTGAAG ATATGCAGGA AGTTGTTGTG 840
CATAAAAAAA AGAGGCCTGT TTTAAGAGAT TATTGGCAGA AACATGCAGG AATGGCAATG 900

CTCTGTGAAA CGATAGAAGA ATGTTGGGAT CATGATGCAG AAGCCAGGTT ATCAGCTGGA 960
TGTGTAGGTG AAAGAATTAC TCAGATGCAA AGACTAACAA ATATCATTAC TACAGAGGAC 1020
ATTGTAACAG TGGTCACAAT GGTGACAAAT GTTGACTTTC CTCCCAAAGA ATCTAGTCTA 1080
TGATGGTGGC ACCGTCTGTA CACACTGAGG ACTGGGACTC TGAAGTGGAG CTGCTAAGCT 1140
5 AAGGAAAGTG CTTAGTTGAT TTTCTGTGTG AAATGAGTAG GATGCCTCCA GGACATGTAC 1200
GCAAGCAGCC CCTTGTGGAA AGCATGGATC TGGGAGATGG ATCTGGGAAA CTTACTGCAT 1260
CGTCTGCAGC ACAGATATGA AGAGGAGTCT AAGGGAAAAG CTGCAAACTG TAAAGAACTT 1320
CTGAAAATGT ACTCGAAGAA TGTGGCCCTC TCCAAATCAA GGATCTTTTG GACCTGGCTA 1380
ATCAAGTATT TGCAAACTG ACATCAGATT TCTTAATGTC TGTCAGAAGA CACTAATTCC 1440
10 TTAAATGAAC TACTGCTATT TTTTTT 1466
<210>2
<211>1391
<212>DNA
<213>Mouse
15 <400>2
TCGCCGCCAC GACGCGCCCA GCACCTCCGA GCGACTGACC GACCTCCACG CGCGTCCCGA 60
ACACACTGCC ACCGCCGCCG CCGCCGCGCG CGCTCGCGCC GCACTCCCTC GCACGTCACC 120
ACGTGCGCTG CCGCCAACGC CTCCCGGCCG CTTCCGGCTC TGATGCCTGA GCGAATCACA 180
GGCGAGCTCC CGGGAAGATC CCGCTCTGAG GCTCCGCCCC CGGACAGGGC CCCGCCACC 240
20 TCATAGCTCT TTTCCTCAGC CGCCCCCTCC TTCCTTCTCG GCTCAACTAG GTCAGCGCAA 300
GGTGATCCCG GAGAGCGGGG CGGCGGGGAC CGCTCCTCCT GTTACTTATC GAGCGCGCGC 360
TCCCTCCCGA GCCTCACACC CTCGCTTCGC CCTTTTTTTT CCACTGTCCA GGAAGTGGTT 420
CCCTCCTTCC TCTTCCACCT GCCCTACCTT CTCCAGAGAT CCGACGTGGC GATTAGAGTT 480
CTCAGCGTCA CACTGACTTC TAGGCAACTA GCCTAGACTG GAGCTGCGTG TTGTGGGAAC 540
25 CCCGCGGCAG TAGTTGAGCA TCAGGCTCTT ACCTTGGAGG TGGAGGGGTG AGAAGAATAG 600
AGGAAGAAGG GATAAGTCAG AGGAGGGCCT GAACAAC TAG CCCCTCTATT GGCCTGCTTT 660
GGGTGAGCAT TCAGTGAGTG TGTTTAAAAA AAAAAAGGGA GGGAAAACAA AAGACCTCAG 720
GAGCAGTTTT GTGTTGCTGT GTCTGGCTTC AAGAAGAAAA TTCTAGACAT TTATGCCGGC 780
AAGACCAAAG CTCAGCTAAG ACTACTTCTC CCAAGAAGAT AATTGTATCA GAGGATGGGT 840

TGGATCAGTA CAGGTGGTTT GAGGAGACGC TGACAGAGGA CCATGGAAAG GTGGGAGAGG 900
ACGCGCGGCT CCTGGGCTTC CTCTGAGCTC AGCTCCAGGC ACCACAAGGC CACATAAGGA 960
GGGTGAGGTC CCTGGAGTGG ACTACATTTT CATAACCGTT GAGGAGTTTA TGGAATTGGA 1020
GAAAAGTGGT GCTCTCCTAG AAAGCGGGAC CTATGAAGAC AACTACTACG GTACCCCGAA 1080
5 GCCTCCAGCT GAACCAGCAC CATTATTAAA TGTAACAGAC CAGATACTTC CGGGAGCTAC 1140
TCCAAGTGCT GAGGGGAAGC GGAAAAGAAA TAAGTCAGTG ACCAACATGG AGAAAGCAAG 1200
TATAGAGCCT CCAGAGGAGG AAGAAGAAGA AAGGCCTGTA GTCAATGGAA ACGGCGTGGT 1260
CATAACCCCA GAATCCAGTG AACATGAAGA CAAAAGTGCA GGTGCCTCAG GGGAGACACC 1320
CTCCCAGCCT TACCCTGCAC CCGTGTACAG CCAGCCCGAA GAGCTCAAGG ACCAGATGGA 1380
10 CGATACAAAG C 1391
<210>3
<211>1431
<212>DNA
<213>Mouse
15 <400>3
CAGTTGAAGG GAACGTTCTT CAGCACCACC CTCAAAAAGA GCAACATGGG CTTTGGGTTT 60
ACCATAATTG GTGGAGACGA GCCGGATGAG TTTCTACAGG TGAAAAGTGT GATCCCGGAT 120
GGGCCTGCCG CACAGGATGG GAAAATGGAG ACAGGTGATG TCATTGTCTA TATTAATGAA 180
GTTTGTGTCC TTGGACACAC TCATGCAGAT GTTGTCAAAC TTTTCCAGTC TGTTCTTATT 240
20 GGTGAGAGTG TCAACTTGGT GTTGTGTCGT GGCTACCCTT TGCCCTTTGA CCCTGAAGAT 300
CCTGCTAACA GCATGGTGCC ACCCCTTGCA ATAATGGAGA GGCCACCTCC GGTGATGGTC 360
AATGGAAGAC ATAACTATGA AACATACTTG GAATACATTT CTCGGACCTC ACAGTCGGTC 420
CCAGATATTA CAGACCGGCC ACCTCATTCT TTGCACTCCA TGCCAGCTGA CGGCCAGCTA 480
GATGGCACGT ATCCACCACC CGTCCATGAC GACAATGTGT CTATGGCTTC GTCTGGAGCC 540
25 ACTCAAGCTG AACTTATGAC CTTAACCATT GTGAAAGGTG CCCAGGGATT TGGCTTTACT 600
ATTGCCGACA GTCCACGGG ACAGCGGGTG AAACAAATCC TTGACATTCA GGGATGCCCT 660
GGGCTGTGTG AAGGAGACCT CATTGTTGAG ATCAACCAAC AGAATGTACA GAACCTGAGC 720
CATACAGAAG TAGTGGATAT ACTTAAGGAC TGCCCCGTTG GAAGTGAGAC TTCTTTAATC 780
ATCCATCGAG GAGGTTTCTT TTCTCCATGG AAAACTCCAA AGCCTATGAT GGACCGATGG 840

GAGAACCAAG GCAGTCCACA AACAAGTTTA TCTGCTCCGG CCGTCCCACA GAACCTGCCC 900
TTCCACCTG CCCTTCACAG GAGCTCCTTT CCTGATTCAA CAGAGGCCTT TGACCCACGG 960
AAGCCTGACC CATATGAGCT CTACGAGAAA TCGAGAGCCA TTTATGAAAG TAGGCAACAA 1020
GTGCCACCCA GGACCAGTTT TCGAATGGAT TCCTCTGGTC CAGATTATAA GGAACCTGGAT 1080
5 GTTCACCTTC GGAGGATGGA GTCTGGATTT GGCTTTAGAA TCCTTGGGGG AGATGAACCT 1140
GGACAGCCTA TTTTGATCGG AGCCGTCATT GCCATGGGCT CAGCTGACAG AGACGGCCCGT 1200
CTACACCCAG GAGATGAGCT TGTCTATGTC GATGGGATCC CAGTGGCTGG CAAGACCCAC 1260
CGCTATGTCA TCGACCTCAT GCACCACGCG GCCC GCAATG GGCAGGTAA CCTCACTGTG 1320
AGAAGAAAGG TGCTATGTGG AGGGGAGCCC TGCCCAGAGA ATGGGAGGAG TCCAGGCTCT 1380
10 GTATCAACTC ACCACAGCTC TCCGCGCAGT GACTATGCCA CCTACTCCA C 1431
<210>4
<211>1085
<212>DNA
<213>Mouse
15 <400>4
ACCATAACTG TGCCCCATAA AATTGGACGA ATCATTGATG GGAGCCCTGC AGATCGCTGT 60
GCCAAACTCA AAGTGGGCGA CCGTATCTTA GCAGTCAACG GCCAGTCTAT CATCAACATG 120
CCTCACGCTG ACATTGTGAA GCTCATCAAG GACGCCGGTC TCAGTGTCAC CCTTCGCATC 180
ATTCCTCAGG AGGAGCTCAA CAGCCCAACA TCAGCACCCA GTTCAGAGAA ACAGAGCCCC 240
20 ATGGCCCAGC AGCACAGCCC TCTGGCCCAG CAGAGTCCTC TGGCCCAGCC AAGCCCCGCC 300
ACCCCAACA GCCCAGTCGC ACAGCCAGCT CCTCCCAAC CTCTCCAGCT GCAAGGACAC 360
GAAAATAGTT ACAGGTCAGA AGTTAAAGCG AGGCAAGATG TGAAGCCAGA CATCCGGCAG 420
CCTCCCTTCA CAGACTACAG GCAGCCCCCG CTGGACTACA GGCAGCCCCC GGGAGGAGAC 480
TACTCACAGC CCCCACCCTT GGA CTACAGG CAGCACTCTC CAGACACCAG GCAGTACCCT 540
25 CTGTCAGACT ACAGGCAGCC ACAGGATTTT GATTATTTCA CTGTGGACAT GGAGAAAGGA 600
GCCAAAGGAT TTGGATTCAG CATTCGTGGA GGAAGGGAAT ACAAGATGGA TCTGTATGTG 660
TTGAGATTGG CAGAGGATGG GCCAGCCATA AGGAACGGCA GGATGAGGGT AGGAGATCAG 720
ATCATTGAAA TAAATGGGGA AAGCACACGA GACATGACCC ACGCCAGAGC AATAGAACTC 780
ATCAAGTCTG GAGGAAGAAG AGTGCGGCTG CTGCTGAAGA GAGGCACGGG GCAGGTCCCC 840

GAGTATGGAA TGGTACCTTC CAGCCTCTCC ATGTGCATGA AAAGTGACAA GCATGGGTCC 900
 CCATATTTCT ACTTACTGGG CCACCCTAAA GACACGACGA ACCCCACGCC TGGAGTGCTG 960
 CCGCTGCCGC CGCCCCAGGC CTGCCGGAAG TAGGCGTCTC CCTCGAAGAC ATCCTCTCTC 1020
 CATTCTCTCC ATCACATCCA GCCCCACCCT CCGACCCTTC CCACCAGATA GGCCCAGACC 1080
 5 CAACT 1085
 <210>5
 <211>1161
 <212>PRT
 <213>Mouse
 10 <400>5
 Gly Asp Ala Asp Arg Gly Pro Trp Lys Gly Gly Arg Gly Arg Ala Ala
 1 5 10 15
 Pro Gly Leu Pro Leu Ser Ser Ala Pro Gly Thr Thr Arg Pro His Lys
 20 25 30
 15 Glu Gly Glu Val Pro Gly Val Asp Tyr Ile Phe Ile Thr Val Glu Glu
 35 40 45
 Phe Met Glu Leu Glu Lys Ser Gly Ala Leu Leu Glu Ser Gly Thr Tyr
 50 55 60
 Glu Asp Asn Tyr Tyr Gly Thr Pro lys Pro Pro Ala Glu Pro Ala Pro
 20 65 70 75 80
 Leu Leu Asn Val Thr Asp Gln Ile Leu Pro Gly Ala Thr Pro Ser Ala
 85 90 95
 Glu Gly Lys Arg Lys Arg Asn Lys Ser Val Thr Asn Met Glu Lys Ala
 100 105 110
 25 Ser Ile Glu Pro Pro Glu Glu Glu Glu Glu Arg Pro Val Val Asn
 115 120 125
 Gly Asn Gly Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Ser Glu His Glu Asp Lys
 130 135 140
 Ser Ala Gly Ala Ser Gly Glu Thr Pro Ser Gln Pro Tyr Pro Ala Pro



25

Gln Ser Val Asn Leu Val Leu Cys Arg Gly Tyr Pro Leu Pro Phe Asp
 385 390 395 400
 Pro Glu Asp Pro Ala Asn Ser Met Val Pro Pro Leu Ala Ile Met Glu
 405 410 415
 5 Arg Pro Pro Pro Val Met Val Asn Gly Arg His Asn Tyr Glu Thr Tyr
 420 425 430
 Leu Glu Tyr Ile Ser Arg Thr Ser Gln Ser Val Pro Asp Ile Thr Asp
 435 440 445
 Arg Pro Pro His Ser Leu his Ser Met Pro Ala Asp Gly Gln Leu Asp
 10 450 455 460
 Gly Thr Tyr Pro Pro Pro Val His Asp Asp Asn Val Ser Met Ala Ser
 465 470 475 480
 Ser Gly Ala Thr Gln Ala Glu Leu Met Thr Leu Thr Ile Val Lys Gly
 485 490 495
 15 Ala Gln Gly Phe Gly Phe Thr Ile Ala Asp Ser Pro Thr Gly Gln Arg
 500 505 510
 Val Lys Gln Ile Leu Asp Ile Gln Gly Cys Pro Gly Leu Cys Glu Gly
 515 520 525
 Asp Leu Ile Val Glu Ile Asn Gln Gln Asn Val Gln Asn Leu Ser His
 20 530 535 540
 Thr Glu Val Val Asp Ile Leu Lys Asp Cys Pro Val Gly Ser Glu Thr
 545 550 555 560
 Ser Leu Ile Ile His Arg Gly Gly Phe Phe Ser Pro Trp Lys Thr Pro
 565 570 575
 25 Lys Pro Met Met Asp Arg Trp Glu Asn Gln Gly Ser Pro Gln Thr Ser
 580 585 590
 Leu Ser Ala Pro Ala Val Pro Gln Asn Leu Pro Phe Pro Pro Ala Leu
 595 600 605
 His Arg Ser Ser Phe Pro Asp Ser Thr Glu Ala Phe Asp Pro Arg Lys

8/19

610 615 620
Pro Asp Pro Tyr Glu Leu Tyr Glu Lys Ser Arg Ala Ile Tyr Glu Ser
625 630 635 640
Arg Gln Gln Val Pro Pro Arg Thr Ser Phe Arg Met Asp Ser Ser Gly
5 645 650 655
Pro Asp Tyr Lys Glu Leu Asp Val His Leu Arg Arg Met Glu Ser Gly
660 665 670
Phe Gly Phe Arg Ile Leu Gly Gly Asp Glu Pro Gly Gln Pro Ile Leu
675 680 685
10 Ile Gly Ala Val Ile Ala Met Gly Ser Ala Asp Arg Asp Gly Arg Leu
690 695 700
His Pro Gly Asp Glu Leu Val Tyr Val Asp Gly Ile Pro Val Ala Gly
705 710 715 720
Lys Thr His Arg Tyr Val Ile Asp Leu Met His His Ala Ala Arg Asn
15 725 730 735
Gly Gln Val Asn Leu Thr Val Arg Arg Lys Val Leu Cys Gly Gly Glu
740 745 750
Pro Cys Pro Glu Asn Gly Arg Ser Pro Gly Ser Val Ser Thr His His
755 760 765
20 Ser Ser Pro Arg Ser Asp Tyr Ala Thr Tyr Ser Asn Ser Asn His Ala
770 775 780
Ala Pro Ser Ser Asn Ala Ser Pro Pro Glu Gly Phe Ala Ser His Ser
785 790 795 800
Leu Gln Thr Ser Asp Val Val Ile His Arg Lys Glu Asn Glu Gly Phe
25 805 810 815
Gly Phe Val Ile Ile Ser Ser Leu Asn Arg Pro Glu Ser Gly Ala Thr
820 825 830
Ile Thr Val Pro His Lys Ile Gly Arg Ile Ile Asp Gly Ser Pro Ala
835 840 845

Asp Arg Cys Ala Lys Leu Lys Val Gly Asp Arg Ile Leu Ala Val Asn
 850 855 860
 Gly Gln Ser Ile Ile Asn Met Pro His Ala Asp Ile Val Lys Leu Ile
 865 870 875 880
 5 Lys Asp Ala Gly Leu Ser Val Thr Leu Arg Ile Ile Pro Gln Glu Glu
 885 890 895
 Leu Asn Ser Pro Thr Ser Ala Pro Ser Ser Glu Lys Gln Ser Pro Met
 900 905 910
 Ala Gln Gln His Ser Pro Leu Ala Gln Gln Ser Pro Leu Ala Gln Pro
 10 915 920 925
 Ser Pro Ala Thr Pro Asn Ser Pro Val Ala Gln Pro Ala Pro Pro Gln
 930 935 940
 Pro Leu Gln Leu Gln Gly His Glu Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Val Lys
 945 950 955 960
 15 Ala Arg Gln Asp Val Lys Pro Asp Ile Arg Gln Pro Pro Phe Thr Asp
 965 970 975
 Tyr Arg Gln Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Gly Asp Tyr
 980 985 990
 Ser Gln Pro Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln His Ser Pro Asp Tyr Arg
 20 995 1000 1005
 Gln Tyr Pro Leu Ser Asp Tyr Arg Gln Pro Gln Asp Phe Asp Tyr Phe
 1010 1015 1020
 Thr Val Asp Met Glu Lys Gly Ala Lys Gly Phe Gly Phe Ser Ile Arg
 1025 1030 1035 1040
 25 Gly Gly Arg Glu Tyr Lys Met Asp Leu Tyr Val Leu Arg Leu Ala Glu
 1045 1050 1055
 Asp Gly Pro Ala Ile Arg Asn Gly Arg Met Arg Val Gly Asp Gln Ile
 1060 1065 1070
 Ile Glu Ile Asn Gly Glu Ser Thr Arg Asp Met Thr His Ala Arg Ala

10/19

1075 1080 1085
 Ile Glu Leu Ile Lys Ser Gly Gly Arg Arg Val Arg Leu Leu Leu Lys
 1090 1095 1100
 Arg Gly Thr Gly Gln Val Pro Glu Tyr Gly Met Val Pro Ser Ser Leu
 5 1105 1110 1115 1120
 Ser Met Cys Met Lys Ser Asp Lys His Gly Ser Pro Tyr Phe Tyr Leu
 1125 1130 1135
 Leu Gly His Pro Lys Asp Thr Thr Asn Pro Thr Pro Gly Val Leu Pro
 1140 1145 1150
 10 Leu Pro Pro Pro Gln Ala Cys Arg Lys
 1155 1160 1161
 <210>6
 <211>1112
 <212>PRT
 15 <213>Mouse
 <400>6
 Met Glu Leu Glu Lys Ser Gly Ala Leu Leu Glu Ser Gly Thr Tyr Glu
 5 10 15
 Asp Asn Tyr Tyr Gly Thr Pro lys Pro Pro Ala Glu Pro Ala Pro Leu
 20 20 25 30
 Leu Asn Val Thr Asp Gln Ile Leu Pro Gly Ala Thr Pro Ser Ala Glu
 35 40 45
 Gly Lys Arg Lys Arg Asn Lys Ser Val Thr Asn Met Glu Lys Ala Ser
 50 55 60
 25 Ile Glu Pro Pro Glu Glu Glu Glu Glu Arg Pro Val Val Asn Gly
 65 70 75 80
 Asn Gly Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Ser Glu His Glu Asp Lys Ser
 85 90 95
 Ala Gly Ala Ser Gly Glu Thr Pro Ser Gln Pro Tyr Pro Ala Pro Val

	100	105	110
	Tyr Ser Gln Pro Glu Glu Leu Lys Asp Gln Met Asp Asp Thr Lys Pro		
	115	120	125
	Thr Lys Pro Glu Glu Asn Glu Asp Ser Asp Pro Leu Pro Asp Asn Trp		
5	130	135	140
	Glu Met Ala Tyr Thr Glu Lys Gly Glu Val Tyr Phe Ile Asp His Asn		
	145	150	155
	Thr Lys Thr Thr Ser Trp Leu Asp Pro Arg Leu Ala Lys Lys Ala Lys		
	165	170	175
10	Pro Pro Glu Glu Cys Lys Glu Asn Glu Leu Pro Tyr Gly Trp Glu Lys		
	180	185	190
	Ile Asp Asp Pro Ile Tyr Gly Thr Tyr Tyr Val Asp His Ile Asn Arg		
	195	200	205
	Arg Thr Gln Phe Glu Asn Pro Val Leu Glu Ala Lys arg Lys Leu Gln		
15	210	215	220
	Gln His Asn Met Pro His Thr Glu Leu Gly Ala Lys Pro Leu Gln Ala		
	225	230	235
	Pro Gly Phe Arg Glu Lys Pro Leu Phe Thr Arg Asp Ala Ser Gln Leu		
	245	250	255
20	Lys Gly Thr Phe Leu Ser Thr Thr Leu Lys Lys Ser Asn Met Gly Phe		
	260	265	270
	Gly Phe Thr Ile Ile Gly Gly Asp Glu Pro Asp Glu Phe Leu Gln Val		
	275	280	285
	Lys Ser Val Ile Pro Asp Gly Pro Ala Ala Gln Asp Gly Lys Met Glu		
25	290	295	300
	Thr Gly Asp Val Ile Val Tyr Ile Asn Glu Val Cys Val Leu Gly His		
	305	310	315
	Thr His Ala Asp Val Val Lys Leu Phe Gln Ser Val Pro Ile Gly Gln		
	325	330	335

12/19

Ser Val Asn Leu Val Leu Cys Arg Gly Tyr Pro Leu Pro Phe Asp Pro
340 345 350
Glu Asp Pro Ala Asn Ser Met Val Pro Pro Leu Ala Ile Met Glu Arg
355 360 365
5 Pro Pro Pro Val Met Val Asn Gly Arg His Asn Tyr Glu Thr Tyr Leu
370 375 380
Glu Tyr Ile Ser Arg Thr Ser Gln Ser Val Pro Asp Ile Thr Asp Arg
385 390 395 400
Pro Pro His Ser Leu his Ser Met Pro Ala Asp Gly Gln Leu Asp Gly
10 405 410 415
Thr Tyr Pro Pro Pro Val His Asp Asp Asn Val Ser Met Ala Ser Ser
420 425 430
Gly Ala Thr Gln Ala Glu Leu Met Thr Leu Thr Ile Val Lys Gly Ala
435 440 445
15 Gln Gly Phe Gly Phe Thr Ile Ala Asp Ser Pro Thr Gly Gln Arg Val
450 455 460
Lys Gln Ile Leu Asp Ile Gln Gly Cys Pro Gly Leu Cys Glu Gly Asp
465 470 475 480
Leu Ile Val Glu Ile Asn Gln Gln Asn Val Gln Asn Leu Ser His Thr
20 485 490 495
Glu Val Val Asp Ile Leu Lys Asp Cys Pro Val Gly Ser Glu Thr Ser
500 505 510
Leu Ile Ile His Arg Gly Gly Phe Phe Ser Pro Trp Lys Thr Pro Lys
515 520 525
25 Pro Met Met Asp Arg Trp Glu Asn Gln Gly Ser Pro Gln Thr Ser Leu
530 535 540
Ser Ala Pro Ala Val Pro Gln Asn Leu Pro Phe Pro Pro Ala Leu His
545 550 555 560
Arg Ser Ser Phe Pro Asp Ser Thr Glu Ala Phe Asp Pro Arg Lys Pro

	565	570	575
	Asp Pro Tyr Glu Leu Tyr Glu Lys Ser Arg Ala Ile Tyr Glu Ser Arg		
	580	585	590
	Gln Gln Val Pro Pro Arg Thr Ser Phe Arg Met Asp Ser Ser Gly Pro		
5	595	600	605
	Asp Tyr Lys Glu Leu Asp Val His Leu Arg Arg Met Glu Ser Gly Phe		
	610	615	620
	Gly Phe Arg Ile Leu Gly Gly Asp Glu Pro Gly Gln Pro Ile Leu Ile		
	625	630	635
10	Gly Ala Val Ile Ala Met Gly Ser Ala Asp Arg Asp Gly Arg Leu His		
	645	650	655
	Pro Gly Asp Glu Leu Val Tyr Val Asp Gly Ile Pro Val Ala Gly Lys		
	660	665	670
	Thr His Arg Tyr Val Ile Asp Leu Met His His Ala Ala Arg Asn Gly		
15	675	680	685
	Gln Val Asn Leu Thr Val Arg Arg Lys Val Leu Cys Gly Gly Glu Pro		
	690	695	700
	Cys Pro Glu Asn Gly Arg Ser Pro Gly Ser Val Ser Thr His His Ser		
	705	710	715
20	Ser Pro Arg Ser Asp Tyr Ala Thr Tyr Ser Asn Ser Asn His Ala Ala		
	725	730	735
	Pro Ser Ser Asn Ala Ser Pro Pro Glu Gly Phe Ala Ser His Ser Leu		
	740	745	750
	Gln Thr Ser Asp Val Val Ile His Arg Lys Glu Asn Glu Gly Phe Gly		
25	755	760	765
	Phe Val Ile Ile Ser Ser Leu Asn Arg Pro Glu Ser Gly Ala Thr Ile		
	770	775	780
	Thr Val Pro His Lys Ile Gly Arg Ile Ile Asp Gly Ser Pro Ala Asp		
	785	790	795
			800

Arg Cys Ala Lys Leu Lys Val Gly Asp Arg Ile Leu Ala Val Asn Gly
 805 810 815
 Gln Ser Ile Ile Asn Met Pro His Ala Asp Ile Val Lys Leu Ile Lys
 820 825 830
 5 Asp Ala Gly Leu Ser Val Thr Leu Arg Ile Ile Pro Gln Glu Glu Leu
 835 840 845
 Asn Ser Pro Thr Ser Ala Pro Ser Ser Glu Lys Gln Ser Pro Met Ala
 850 855 860
 Gln Gln His Ser Pro Leu Ala Gln Gln Ser Pro Leu Ala Gln Pro Ser
 10 865 870 875 880
 Pro Ala Thr Pro Asn Ser Pro Val Ala Gln Pro Ala Pro Pro Gln Pro
 885 890 895
 Leu Gln Leu Gln Gly His Glu Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Val Lys Ala
 900 905 910
 15 Arg Gln Asp Val Lys Pro Asp Ile Arg Gln Pro Pro Phe Thr Asp Tyr
 915 920 925
 Arg Gln Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Gly Asp Tyr Ser
 930 935 940
 Gln Pro Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln His Ser Pro Asp Tyr Arg Gln
 20 945 950 955 960
 Tyr Pro Leu Ser Asp Tyr Arg Gln Pro Gln Asp Phe Asp Tyr Phe Thr
 965 970 975
 Val Asp Met Glu Lys Gly Ala Lys Gly Phe Gly Phe Ser Ile Arg Gly
 980 985 990
 25 Gly Arg Glu Tyr Lys Met Asp Leu Tyr Val Leu Arg Leu Ala Glu Asp
 995 1000 1005
 Gly Pro Ala Ile Arg Asn Gly Arg Met Arg Val Gly Asp Gln Ile Ile
 1010 1015 1020
 Glu Ile Asn Gly Glu Ser Thr Arg Asp Met Thr His Ala Arg Ala Ile



1025 1030 1035 1040
 Glu Leu Ile Lys Ser Gly Gly Arg Arg Val Arg Leu Leu Leu Lys Arg
 1045 1050 1055
 Gly Thr Gly Gln Val Pro Glu Tyr Gly Met Val Pro Ser Ser Leu Ser
 5 1060 1065 1070
 Met Cys Met Lys Ser Asp Lys His Gly Ser Pro Tyr Phe Tyr Leu Leu
 1075 1080 1085
 Gly His Pro Lys Asp Thr Thr Asn Pro Thr Pro Gly Val Leu Pro Leu
 1090 1095 1100
 10 Pro Pro Pro Gln Ala Cys Arg Lys
 1105 1110 1112
 <210>7
 <211>3483
 <212>DNA
 15 <213>Mouse
 <400>7
 GGAGACGCTG ACAGAGGACC ATGGAAAGGT GGGAGAGGAC GCGCGGCTCC TGGGCTTCCT 60
 CTGAGCTCAG CTCCAGGCAC CACAAGGCCA CATAAGGAGG GTGAGGTCCC TGGAGTGGAC 120
 TACATTTTCA TAACCGTTGA GGAGTTTATG GAATTGGAGA AAAGTGGTGC TCTCCTAGAA 180
 20 AGCGGGACCT ATGAAGACAA CTACTACGGT ACCCCGAAGC CTCCAGCTGA ACCAGCACCA 240
 TTATTAAATG TAACAGACCA GATACTTCCG GGAGCTACTC CAAGTGCTGA GGGGAAGCGG 300
 AAAAGAAATA AGTCAGTGAC CAACATGGAG AAAGCAAGTA TAGAGCCTCC AGAGGAGGAA 360
 GAAGAAGAAA GGCCTGTAGT CAATGGAAAC GGCCTGGTCA TAACCCCAAGA ATCCAGTGAA 420
 CATGAAGACA AAAGTGCAGG TGCCTCAGGG GAGACACCCT CCCAGCCTTA CCCTGCACCC 480
 25 GTGTACAGCC AGCCCGAAGA GCTCAAGGAC CAGATGGACG ATACAAAGCC AACAAAGCCT 540
 GAGGAGAACG AGGACTCTGA TCCATTGCCT GATAACTGGG AAATGGCCTA CACAGAGAAG 600
 GGGGAAGTCT ACTTCATTGA CCATAACACA AAGACAACAT CATGGCTGGA TCCGCGACTT 660
 GCGAAAAAGG CTAAACCTCC AGAAGAGTGC AAAGAAAATG AGCTTCCATA TGGCTGGGAA 720
 AAAATCGATG ATCCTATATA TGGCACTTAC TATGTTGACC ACATAAATAG AAGAACACAG 780

TTTGAAAACC CTGTCCTGGA AGCAAAAAGG AAGCTACAGC AACATAACAT GCCCCACACA 840
GAACTTGGAG CAAAGCCCCT GCAGGCCCCA GGTTCCTGAG AAAAGCCACT CTTCACCCGG 900
GATGCATCCC AGTTGAAGGG AACGTTCTC AGCACCACCC TCAAAAAGAG CAACATGGGC 960
TTTGGGTTTA CCATAATTGG TGGAGACGAG CCGGATGAGT TTCTACAGGT GAAAAGTGTG 1020
5 ATCCCGGATG GGCCTGCCGC ACAGGATGGG AAAATGGAGA CAGGTGATGT CATTGTCTAT 1080
ATTAATGAAG TTTGTGTCCT TGGACACACT CATGCAGATG TTGTCAAACCT TTTCCAGTCT 1140
GTTCTATTG GTCAGAGTGT CAACTTGGTG TTGTGTCGTG GCTACCCTTT GCCCTTTGAC 1200
CCTGAAGATC CTGCTAACAG CATGGTGCCA CCCCTTGCAA TAATGGAGAG GCCACCTCCG 1260
GTGATGGTCA ATGGAAGACA TAACTATGAA ACATACTTGG AATACATTTT TCGGACCTCA 1320
10 CAGTCGGTCC CAGATATTAC AGACCGGCCA CCTCATTCTT TGCACTCCAT GCCAGCTGAC 1380
GGCCAGCTAG ATGGCACGTA TCCACCACCC GTCCATGACG ACAATGTGTC TATGGCTTCG 1440
TCTGGAGCCA CTCAAGCTGA ACTTATGACC TTAACCATTG TGAAAGGTGC CCAGGGATTT 1500
GGCTTTACTA TTGCCGACAG TCCCACGGGA CAGCGGGTGA AACAAATCCT TGACATTGAG 1560
GGATGCCCTG GGCTGTGTGA AGGAGACCTC ATTGTTGAGA TCAACCAACA GAATGTACAG 1620
15 AACCTGAGCC ATACAGAAGT AGTGGATATA CTTAAGGACT GCCCCGTTGG AAGTGAGACT 1680
TCTTTAATCA TCCATCGAGG AGGTTTCTTT TCTCCATGGA AAATCCAAA GCCTATGATG 1740
GACCGATGGG AGAACCAAGG CAGTCCACAA ACAAGTTTAT CTGCTCCGGC CGTCCCACAG 1800
AACCTGCCCT TCCCACCTGC CCTTCACAGG AGCTCCTTTC CTGATTCAAC AGAGGCCTTT 1860
GACCCACGGA AGCCTGACCC ATATGAGCTC TACGAGAAAT CGAGAGCCAT TTATGAAAGT 1920
20 AGGCAACAAG TGCCACCCAG GACCAGTTTT CGAATGGATT CCTCTGGTCC AGATTATAAG 1980
GAACTGGATG TTCACCTTCG GAGGATGGAG TCTGGATTTG GCTTTAGAAT CCTTGGGGGA 2040
GATGAACCTG GACAGCCTAT TTTGATCGGA GCCGTCATTG CCATGGGCTC AGCTGACAGA 2100
GACGGCCGTC TACACCCAGG AGATGAGCTT GTCTATGTCG ATGGGATCCC AGTGGCTGGC 2160
AAGACCCACC GCTATGTCAT CGACCTCATG CACCACGCGG CCCGCAATGG GCAGGTTAAC 2220
25 CTCACTGTGA GAAGAAAGGT GCTATGTGGA GGGGAGCCCT GCCCAGAGAA TGGGAGGAGT 2280
CCAGGCTCTG TATCAACTCA CCACAGCTCT CCGCGCAGTG ACTATGCCAC CTACTCCAAC 2340
AGCAACCACG CCGCCCCCAG CAGCAATGCC TCACCTCCTG AAGGCTTTGC CTCACACAGC 2400
TTGCAGACCA GTGATGTGGT CATTACCCGC AAAGAAAACG AAGGGTTTGG CTTCGTCATC 2460
ATCAGCTCTC TGAACAGGCC TGAGTCTGGA GCCACCATAA CTGTGCCCCA TAAAATTGGA 2520

CGAATCATTG ATGGGAGCCC TGCAGATCGC TGTGCCAAAC TCAAAGTGGG CGACCGTATC 2580
TTAGCAGTCA ACGGCCAGTC TATCATCAAC ATGCCTCACG CTGACATTGT GAAGCTCATC 2640
AAGGACGCCG GTCTCAGTGT CACCCTTCGC ATCATTCTC AGGAGGAGCT CAACAGCCCA 2700
ACATCAGCAC CCAGTTCAGA GAAACAGAGC CCCATGGCCC AGCAGCACAG CCCTCTGGCC 2760
5 CAGCAGAGTC CTCTGGCCCA GCCAAGCCCC GCCACCCCCA ACAGCCCAGT CGCACAGCCA 2820
GCTCCTCCCC AACCTCTCCA GCTGCAAGGA CACGAAAATA GTTACAGGTC AGAAGTTAAA 2880
GCGAGGCAAG ATGTGAAGCC AGACATCCGG CAGCCTCCCT TCACAGACTA CAGGCAGCCC 2940
CCGCTGGACT ACAGGCAGCC CCCGGGAGGA GACTACTCAC AGCCCCACC CTTGGACTAC 3000
AGGCAGCACT CTCCAGACAC CAGGCAGTAC CCTCTGTCAG ACTACAGGCA GCCACAGGAT 3060
10 TTTGATTATT TCACTGTGGA CATGGAGAAA GGAGCCAAAG GATTTGGATT CAGCATTCGT 3120
GGAGGAAGGG AATACAAGAT GGATCTGTAT GTGTTGAGAT TGGCAGAGGA TGGGCCAGCC 3180
ATAAGGAACG GCAGGATGAG GGTAGGAGAT CAGATCATTG AAATAAATGG GGAAAGCACA 3240
CGAGACATGA CCCACGCCAG AGCAATAGAA CTCATCAAGT CTGGAGGAAG AAGAGTGCGG 3300
CTGCTGCTGA AGAGAGGCAC GGGGCAGGTC CCGGAGTATG GAATGGTACC TTCCAGCCTC 3360
15 TCCATGTGCA TGAAAAGTGA CAAGCATGGG TCCCCATATT TCTACTTACT GGGCCACCCT 3420
AAAGACACGA CGAACCCAC GCCTGGAGTG CTGCCGCTGC CGCCGCCCA GGCCTGCCGG 3480
AAG 3483

<210>8

<211>3336

20 <212>DNA

<213>Mouse

<400>8

ATGGAATTGG AGAAAAGTGG TGCTCTCCTA GAAAGCGGGA CCTATGAAGA CAACTACTAC 60
GGTACCCCGA AGCCTCCAGC TGAACCAGCA CCATTATTAA ATGTAACAGA CCAGATACTT 120
25 CCGGGAGCTA CTCCAAGTGC TGAGGGGAAG CGGAAAAGAA ATAAGTCAGT GACCAACATG 180
GAGAAAGCAA GTATAGAGCC TCCAGAGGAG GAAGAAGAAG AAAGGCCTGT AGTCAATGGA 240
AACGGCGTGG TCATAACCCC AGAATCCAGT GAACATGAAG ACAAAGTGC AGGTGCCTCA 300
GGGGAGACAC CCTCCCAGCC TTACCCTGCA CCCGTGTACA GCCAGCCCGA AGAGCTCAAG 360
GACCAGATGG ACGATACAAA GCCAACAAAG CCTGAGGAGA ACGAGGACTC TGATCCATTG 420

CCTGATAACT GGGAAATGGC CTACACAGAG AAGGGGGAAG TCTACTTCAT TGACCATAAC 480
ACAAAGACAA CATCATGGCT GGATCCGCGA CTTGCGAAAA AGGCTAAACC TCCAGAAGAG 540
TGCAAAGAAA ATGAGCTTCC ATATGGCTGG GAAAAAATCG ATGATCCTAT ATATGGCACT 600
TACTATGTTG ACCACATAAA TAGAAGAACA CAGTTTGAAG ACCCTGTCCT GGAAGCAAAA 660
5 AGGAAGCTAC AGCAACATAA CATGCCCCAC ACAGAACTTG GAGCAAAGCC CCTGCAGGCC 720
CCAGGTTTCC GAGAAAAGCC ACTCTTCACC CGGGATGCAT CCCAGTTGAA GGAACGTTT 780
CTCAGCACCA CCCTCAAAAA GAGCAACATG GGCTTTGGGT TTACCATAAT TGGTGGAGAC 840
GAGCCGGATG AGTTTCTACA GGTGAAAAGT GTGATCCCGG ATGGGCCTGC CGCACAGGAT 900
GGGAAAATGG AGACAGGTGA TGTCATTGTC TATATTAATG AAGTTTGTGT CTTGGACAC 960
10 ACTCATGCAG ATGTTGTCAA ACTTTTCCAG TCTGTTCTTA TTGGTCAGAG TGTCAACTTG 1020
GTGTTGTGTC GTGGCTACCC TTTGCCCTTT GACCCTGAAG ATCCTGCTAA CAGCATGGTG 1080
CCACCCCTTG CAATAATGGA GAGGCCACCT CCGGTGATGG TCAATGGAAG ACATAACTAT 1140
GAAACATACT TGGAATACAT TTCTCGGACC TCACAGTCGG TCCCAGATAT TACAGACCGG 1200
CCACCTCATT CTTTGCACTC CATGCCAGCT GACGGCCAGC TAGATGGCAC GTATCCACCA 1260
15 CCCGTCCATG ACGACAATGT GTCTATGGCT TCGTCTGGAG CCACTCAAGC TGAACCTATG 1320
ACCTTAACCA TTGTGAAAGG TGCCCAGGGA TTTGGCTTTA CTATTGCCGA CAGTCCCACG 1380
GGACAGCGGG TGAAACAAAT CCTTGACATT CAGGGATGCC CTGGGCTGTG TGAAGGAGAC 1440
CTCATTGTTG AGATCAACCA ACAGAATGTA CAGAACCTGA GCCATACAGA AGTAGTGGAT 1500
ATACTTAAGG ACTGCCCCGT TGGAAGTGAG ACTTCTTTAA TCATCCATCG AGGAGGTTTC 1560
20 TTTTCTCCAT GGAAACTCC AAAGCCTATG ATGGACCGAT GGGAGAACCA AGGCAGTCCA 1620
CAAACAAGTT TATCTGCTCC GGCCGTCCCA CAGAACCTGC CCTTCCCACC TGCCCTTCAC 1680
AGGAGCTCCT TTCCTGATTC AACAGAGGCC TTTGACCCAC GGAAGCCTGA CCCATATGAG 1740
CTCTACGAGA AATCGAGAGC CATTTATGAA AGTAGGCAAC AAGTGCCACC CAGGACCAGT 1800
TTTCGAATGG ATTCCTCTGG TCCAGATTAT AAGGAACTGG ATGTTACCT TCGGAGGATG 1860
25 GAGTCTGGAT TTGGCTTTAG AATCCTTGGG GGAGATGAAC CTGGACAGCC TATTTTGATC 1920
GGAGCCGTCA TTGCCATGGG CTCAGCTGAC AGAGACGGCC GTCTACACCC AGGAGATGAG 1980
CTTGTCTATG TCGATGGGAT CCCAGTGGCT GGCAAGACCC ACCGCTATGT CATCGACCTC 2040
ATGCACCACG CGGCCCCGAA TGGGCAGGTT AACCTCACTG TGAGAAGAAA GGTGCTATGT 2100
GGAGGGGAGC CCTGCCCAGA GAATGGGAGG AGTCCAGGCT CTGTATCAAC TCACCACAGC 2160

TCTCCGCGCA GTGACTATGC CACCTACTCC AACAGCAACC ACGCCGCCCC CAGCAGCAAT 2220
GCCTCACCTC CTGAAGGCTT TGCCTCACAC AGCTTGCAGA CCAGTGATGT GGTCATTAC 2280
CGCAAAGAAA ACGAAGGGTT TGGCTTCGTC ATCATCAGCT CTCTGAACAG GCCTGAGTCT 2340
GGAGCCACCA TAACTGTGCC CCATAAAATT GGACGAATCA TTGATGGGA GCCCTGCAGAT 2400
5 CGCTGTGCCA AACTCAAAGT GGGCGACCGT ATCTTAGCAG TCAACGGCCA GTCTATCATC 2460
AACATGCCTC ACGCTGACAT TGTGAAGCTC ATCAAGGACG CCGGTCTCAG TGTACCCTT 2520
CGCATCATTC CTCAGGAGGA GCTCAACAGC CCAACATCAG CACCCAGTTC AGAGAAACAG 2580
AGCCCCATGG CCCAGCAGCA CAGCCCTCTG GCCCAGCAGA GTCCTCTGGC CCAGCCAAGC 2640
CCCGCCACCC CCAACAGCCC AGTCGCACAG CCAGCTCCTC CCCAACCTCT CCAGCTGCAA 2700
10 GGACACGAAA ATAGTTACAG GTCAGAAGTT AAAGCGAGGC AAGATGTGAA GCCAGACATC 2760
CGGCAGCCTC CCTTCACAGA CTACAGGCAG CCCCCGCTGG ACTACAGGCA GCCCCGGGA 2820
GGAGACTACT CACAGCCCCC ACCCTTGGAC TACAGGCAGC ACTCTCCAGA CACCAGGCAG 2880
TACCCTCTGT CAGACTACAG GCAGCCACAG GATTTTGATT ATTTCACTGT GGACATGGAG 2940
AAAGGAGCCA AAGGATTG GATTGAGCATT CGTGGAGGAA GGGAATACAA GATGGATCTG 3000
15 TATGTGTTGA GATTGGCAGA GGATGGGCCA GCCATAAGGA ACGGCAGGAT GAGGGTAGGA 3060
GATCAGATCA TTGAAATAAA TGGGGAAAGC ACACGAGACA TGACCCACGC CAGAGCAATA 3120
GAACTCATCA AGTCTGGAGG AAGAAGAGTG CGGCTGCTGC TGAAGAGAGG CACGGGGCAG 3180
GTCCCGGAGT ATGGAATGGT ACCTTCCAGC CTCTCCATGT GCATGAAAAG TGACAAGCAT 3240
GGGTCCCCAT ATTTCTACTT ACTGGGCCAC CCTAAAGACA CGACGAACCC CACGCCTGGA 3300
20 GTGCTGCCGC TGCCGCCGCC CCAGGCCTGC CGGAAG 3336



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06275

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/21, A01K 67/027, A61K31/7088, A61K35/76, A61K38/02, A61K45/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P25/08, A61P25/14, A61P43/00, A61P25/00, A61K48/00, A61K48/00, A61K39/395,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/21, A01K 67/027, A61K31/7088, A61K35/76, A61K38/02, A61K45/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P25/08, A61P25/14, A61P43/00, A61P25/00, A61K48/00, A61K48/00, A61K39/395,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq/EMBL/DDBJ/Genbank

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Shoji H., et al. "Identification of a novel type II activin receptor, type IIA-N, induced during the neural differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells.", Biochemical Biophysical Research Communications (1998, May), Vol.246, No.2, p.320-324	17 1-16, 18-28, 30
X A	Sugino H., et al. "Activin: diversity of functions and signal transduction", Seikagaku(1996), Vol.68, No.8, p.1405-1428	17 1-16, 18-28, 30
X A	Funaba M., et al. "Immunolocalization of type I or type II activin receptors in the rat brain", Journal of Neuroendocrinology(1997), Vol.9, No.2, p.105-111	26 1-25, 27, 28, 30
X A	WO, 94/6456, A (Genentech INC), 31 March, 1994 (31.03.94), Claim 23 & JP, 8-501314, A Claim 23 & EP, 661993, A1 & US, 5654404, A & US, 5703048, A	26, 27 1-25, 28, 30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
14 January, 2000 (14.01.00)

Date of mailing of the international search report
25 January, 2000 (25.01.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06275

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	EP, 771873, A2 (Takeda Chem. Ind. Ltd.), 07 May, 1997 (07.05.97), Claim 1, 20 & JP, 10-72497, A Claim 1, 21	17, 26 1-16, 18-25, 27, 28, 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06275

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claim 29 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by this International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2) (a)(i) and Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/21, A01K 67/027, A61K31/7088, A61K35/76, A61K38/02, A61K45/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P25/08, A61P25/14, A61P43/00, A61P25/00, A61K48/00, A61K48/00, A61K39/395,

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/21, A01K 67/027, A61K31/7088, A61K35/76, A61K38/02, A61K45/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P25/08, A61P25/14, A61P43/00, A61P25/00, A61K48/00, A61K48/00, A61K39/395,

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GeneSeq/EMBL/DBJ/Genbank

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Shoji H., et al. "Identification of a novel type II activin receptor, type IIA-N, induced during the neural differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells.", Biochemical Biophysical Research Communications(1998, May), Vol. 246, No. 2, p. 320-324	17 1-16, 18-28, 30
X A	Sugino H., et al. "Activin: diversity of functions and signal transduction", Seikagaku(1996), Vol. 68, No. 8, p. 1405-1428	17 1-16, 18-28, 30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.01.00

国際調査報告の発送日

25.01.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

印

4 N

9 1 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Funaba M., et al. "Immunolocalization of type I or type II activin receptors in the rat brain", Journal of Neuroendocrinology (1997), Vol. 9, No. 2, p. 105-111	26 1-25, 27, 28, 30
X A	WO, 94/6456, A (Genentech INC) 31. 3月. 1994 (31. 03. 94) 請求項 2 3 &JP, 8-501314, A 請求項 2 3 &EP, 661993, A1 &US, 5654404, A &US5703048, A	26, 27 1-25, 28, 30
X A	EP, 771873, A2 (Takeda Chem Ind Ltd) 7. 5月. 1997 (07. 05. 97) 請求項 1 及び 2 0 &JP, 10-72497, A 請求項 1 及び 2 1	17, 26 1-16, 18-25, 27, 28, 30

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 29 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 29 は、人の身体の治療による処置方法に該当するものであるから、PCT 17条(2)(a) 及び PCT 規則 39 (iv) の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

